

English Equivalent See US 5,763,189

# Fluorescence energy transfer and intramolecular energy transfer in particles using novel compounds

Publication number: JP8503994 (T)

Publication date: 1996-04-30

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International: G01N33/543; A61K49/00; C07D487/22; C07F7/10; C07K14/00; C09B47/04; C09B47/06; C09B67/02; C09K11/06; G01N33/58; G01N33/543; A61K49/00; C07D487/00; C07F7/00; C07K14/00; C09B47/04; C09B67/00; C09K11/06; G01N33/58; (IPC1-7): C07D487/22; C07F7/10; C09B47/04; A61K49/00; C07K14/00; C09K11/06; G01N33/543

- European: G01N33/58H4; C09B47/06; C09B67/00T; G01N33/58D

Application number: JP19950509970T 19940923

Priority number(s): WO1994US10826 19940923; US19930126367 19930924; US19930138708 19931018; US19940274534 19940712

## Also published as:

JP3773949 (B2)  
US5763189 (A)  
WO9508772 (A1)  
EP0670041 (A1)  
EP0670041 (A4)  
EP0670041 (B1)  
DE69525186 (T2)  
CA2149419 (A1)  
CA2149419 (C)  
AU8011294 (A)  
AT212721 (T)

<< less

Abstract not available for JP 8503994 (T)

Abstract of corresponding document: US 5763189 (A)

Particles comprising an energy donor as a first component and a fluorescent dye as a second component positioned in said particles at an energy exchanging distance from one another, wherein the two components have a Stokes shift of greater than or equal to 50 nm, said particle having bound on its surface, a protein, polypeptide, nucleic acid, nucleotide or protein containing ligand analogue are disclosed and claimed. In addition, novel fluorescent dyes are described which exhibit intramolecular energy transfer for use to label various molecules, proteins, polypeptides, nucleotides and nucleic acids or to incorporate into particles.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-503994

(43) 公表日 平成8年(1996)4月30日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	片内整理番号	F I
C 0 9 B 47/04		7306-4H	
A 6 1 K 49/00	A	7431-4C	
C 0 7 K 14/00		8318-4H	
C 0 9 K 11/06	Z	9280-4H	
G 0 1 N 33/543	5 7 5	8310-2J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全108頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-509970  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月23日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)5月24日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 1 0 8 2 6  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 0 8 7 7 2  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月30日  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 2 6 , 3 6 7  
 (32) 優先日 1993年9月24日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 3 8 , 7 0 8  
 (32) 優先日 1993年10月18日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 バイオサイト・ダイアグノスティックス・  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア、サ  
 ン・ディエゴ、スウィート・ディー、ロウ  
 ゼル・ストリート11030番  
 (72) 発明者 ビューチャー、ケネス・フランシス  
 アメリカ合衆国92130カリフォルニア、サ  
 ン・ディエゴ、マニフェスト・ブレイス  
 12523番  
 (72) 発明者 ノアー、ジョセフ・バリー  
 アメリカ合衆国92075カリフォルニア、ソ  
 ラナ・ビーチ、ピア・シカ・コート324番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規化合物を用いた粒子内における蛍光エネルギー伝達および分子内エネルギー伝達

## (57) 【要約】

蛍光エネルギー伝達または分子内エネルギー伝達を用いる核酸を含むアナライトの検出または可視化のための粒子および方法。本願は、エネルギーのドナーを第1成分として含有し、蛍光色素を第2成分として、粒子内に互いがエネルギー交換距離である位置に含有しており、該2つの成分が50nm以上のストークス・シフトを有し、該粒子の表面上にタンパク質、ポリペプチド、核酸、ヌクレオチド、またはリガンドアナログを含むタンパク質が結合している粒子を開示し、また請求の範囲とする。さらに、さまざまな分子、タンパク質、ポリペプチド、ヌクレオチドおよび核酸の標識をするのに有用な、または粒子内に取り込ませるための新規な蛍光色素を提供する。本発明は多くの新規なフタロシアニン誘導体およびハイブリッドフタロシアニン誘導体を開示し、請求の範囲とした。これらの誘導体はまた、電子伝達サブユニットを含有するものであってもよい。軸性配位子がハイブリッドフタロシアニンに含有されている金属に共有結合していてもよい。さらに本発明は分子内エネルギー伝達の可能な数多くの化合物を、蛍光エネルギー伝

達化合物と同様に請求の範囲としている。

## 【特許請求の範囲】

1. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分としてエネルギーのアクセプターを、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有し、該粒子の表面に上にタンパク質、ポリペプチド、核酸、ヌクレオチド、またはリガンドアナログを含有するタンパク質が結合している粒子。

2. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分がフタロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

3. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第2成分がフタロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

4. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いの距離がエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分がナフタロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

5. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第2成分がナフタロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

6. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がフタロシアニンであり、第2成分がナフタロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

8. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がスチリ

ルであり、第2成分がナフトロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

10. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がフェニルブタジエニルであり、第2成分がナフトロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

12. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がフェニルヘキサトリエニルであり、第2成分がナフトロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

14. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がボルフィンであり、第2成分がナフトロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

16. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分がカルボシアニン色素であり、第2成分がナフトロシアニンであり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

37. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを有し、さらに互いがエネルギー交換距離にある位置に2種類の蛍光色素を有する粒子であって、該第1成分がトランス-4-[4-(ジブチルアミノ)スチリル]-1-メチルピリジンで

あり、該2種類の色素がシリコンフトロシアニンビス(ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド)およびシリコンフトロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギーのドナーと2種類の色素のストークスシフトが50nm以上である粒子。

38. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを有し、さらに互いがエネルギー交換距離にある位置に3種類の蛍光色素を有する粒子であって、該第1成分がトランス-4-[4-(ジブチルアミノ)スチリル]-1-メチルピリジンで

あり、該3種類の色素がシリコンフタロシアニンビス(ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド)、シリコンフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)およびシリコンフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギーのドナーと3種類の色素のストークスシフトが50nm以上である粒子。

43. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として2種類の蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、第1成分が1, 1'-ジヘキシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニンであり、該2種類の色素はシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)およびシリコンナフタロシアニンビス(ジメチルエチルマレイミドシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギードナーと2種類の蛍光色素のストークスシフトが50nm以上である粒子。

44. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として2種類の蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が1, 1'-ジヘキシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニンの塩であり、該2種の色素がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)およびシリコンフタロシアニンビス(ジメチルエチルマレイミドシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギーのドナーと2種類の色素のストークスシフトが50nm以上である粒子。

57. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオロ-4-ボラ-3a, 4a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)であり、該2つの成分が50nm以上のストークスシフトを有している粒子。

64. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオ

ロ-4-ボラ-3 a, 4 a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)であり、該2つの成分が50 nm以上のストークスシフトを有している粒子。

72. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分がシリコンフタロシアニンビス(マレイミド-フルオロセイン)(FFT化合物)であり、該第2成分がシリコンフタロシアニンビス(マレイミド-フルオロセイン)(FET化合物)および該2つの成分が50 nm以上のストークスシフトを有している粒子。

77. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオロ-4-ボラ-3 a, 4 a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)であり、該2つの成分が50 nm以上のストークスシフトを有している粒子。

86. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として2種類の蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオロ-4-ボラ-3 a, 4 a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分の2種の色素がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)およびシリコンオクタエトキシ2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギードナーと2種類の色素のストークスシフトが50 nm以上である粒子。

101. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として2種類の蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオロ-4-ボラ-3 a, 4 a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分の2種の色素がシリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニ

ルシリルオキシド)および5, 5'-ジクロロ-1, 1'-ジフェニルアミノ-3, 3'-ジエチル-10, 12-エチレンチアトリカルボシアニンの塩からなる群から抽出され、該エネルギードナーと2種類の色素のストークスシフトが50 nm以上である粒子。

104. 粒子内に、第1成分としてエネルギーのドナーを、第2成分として2種類の蛍光色素を、互いがエネルギー交換距離にある位置に含有しており、該第1成分が(E, E)-3, 5-ビス-(4-フェニル-1, 3-ブタジエニル)-4, 4-ジフルオロ-4-ボラ-3a, 4a-ジアゾ-s-インダセンであり、該第2成分の2種の色素がシリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)およびシリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド)からなる群から抽出され、該エネルギーのドナーと2種類の色素が50 nm以上のストークスシフトを有している粒子。

105. 粒子がラテックス粒子である請求項1〜104いずれかに記載の粒子。

106. 粒子内に、ほぼ同一の励起波長と放射波長を有する2またはそれ以上の色素分子を添加し、これによって蛍光消光が減少され、蛍光強度が該色素分子の組み合わせにより増加されるよう改良された改良粒子。

107. 粒子内において第2成分とほぼ同じ励起および放射波長を示す少なくとも1種類の蛍光色素を第3成分としてさらに含有し、これによって消光が減少され、該第2および第3の追加分の組み合わせによって蛍光強度が増加される、請求項1〜36、39〜42、45〜85、87〜100または102〜103のいずれかに記載の粒子。

106. 少なくとも1のさらなる蛍光色素を第4成分として含有し、該第4成分が粒子内で該2つのアクセプター色素とほぼ同じ励起および放射波長を示し、これによって消光が減少され、該2種類の色素および該追加分の組み合わせによって蛍光強度が増強される、請求項37、43、44、86、101または104記載の粒子。

107. 少なくとも1のさらなる蛍光色素を第3成分として含有し、該第3成

分が粒子内で該第2成分とほぼ同じ励起および放射波長を示し、これによって消光が減少し、該第2成分と該追加成分の組み合わせにより蛍光強度が増強される、請求項1〜36、39〜42、43〜85、87〜100または102〜103いずれかに記載のラテックス粒子。

108. 少なくとも1のさらなる蛍光色素を第4成分として含有し、該第4成分が粒子内で該2種のアクセプター色素とほぼ同じ励起および放射波長を示し、これによって消光が減少され、蛍光強度が該2種のアクセプター色素と該追加成分の組み合わせにより増強される、請求項37、43、44、86、101または104記載のラテックス粒子。

109. 請求項1〜104いずれかに記載の粒子を用いて反応混合物内の標的リガンドを検索する、診断アッセイ。

110. a) 少なくとも1の所望の励起ピークを有する出発ドナー色素および少なくとも1の所望の放射ピークを有する最終アクセプター色素を含有する一

連の色素を、該一連の色素中の各色素のスペクトルが、励起エネルギーを最終のアクセプター色素へ伝達する有意なエネルギー伝達が可能であるよう重複し、該微粒子の励起波長が600ナノメートル以上であり、ストークスシフトが50ナノメートル以上となるように選択する；そしてb) 該一連の色素を微粒子内ヘランダムに取り込ませる：工程を含む方法により製造される、蛍光微粒子。

111. 620 nmから750 nmの間に励起ピークを有し、650 nmから850 nmの間に放射ピークを有する請求項110記載の微粒子。

112. 650 nmから900 nmの間に励起ピークを有し、800 nmから1000 nmの間に放射ピークを有する請求項110記載の微粒子。

113. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソーム及びコロイドからなる群から選択される、請求項111記載の微粒子。

114. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソーム及びコロイドからなる群から選択される、請求項112記載の微粒子。

115. A) 1) 所望の励起ピークを有する少なくとも1のドナーサブユニット；および2) 所望の放射ピークを有する少なくとも1のアクセプターサブユニ



ットを有し、該ドナーサブユニットからアクセプターサブユニットへの分子内エネルギー伝達が可能である；少なくとも1のハイブリッドフタロシアニン誘導体を選択する、B) 該ハイブリッドフタロシアニン誘導体を微粒子内ヘランダムに取り込ませる；工程を含む方法にて作成される微粒子。

116. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソーム及びコロイドからなる群から選択される、請求項115記載の微粒子。

117. A) (1) 所望の励起ピークを有する少なくとも1のドナーサブユニット；(2) 所望の放射ピークを有する少なくとも1のアクセプターサブユニット；および(3) 少なくとも1の電子伝達サブユニットを有し、該ドナーサブユニットからアクセプターサブユニットへの分子内エネルギー伝達が可能である；少なくとも1のハイブリッドフタロシアニン誘導体を選択する、B) 該ハイブリッドフタロシアニン誘導体を微粒子内ヘランダムに取り込ませる；工程を含む方法にて作成される微粒子。

118. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソームおよびコロイドからなる群から選択される、請求項117記載の微粒子。

119. A) (1) 所望の励起ピークを有する少なくとも1のドナーサブユニット；(2) 所望の放射ピークを有する少なくとも1のアクセプターサブユニット；および(3) ハイブリッドフタロシアニン内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性配位子を有し、該ドナーサブユニットからアクセプターサブユニットへの分子内エネルギー伝達が可能である；少なくとも1の金属含有ハイブリッドフタロシアニン誘導体を選択する、B) 該ハイブリッドフタロシアニン誘導体を微粒子内へ取り込ませる；工程を含む方法にて作成される微粒子。

120. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソームおよびコロイドからなる群から選択される、請求項119記載の微粒子。

121. A) ハイブリッドフタロシアニン内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性配位子を有する、少なくとも1の金属含有ハイブリッドフタロシアニン誘導体を選択する；B) 該ハイブリッドフタロシアニン誘導体を微粒子内へ取り込ませる；工程を含む方法にて作成される微粒子。

122. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソームおよびコロイドからなる群から選択される、請求項121記載の微粒子。

123. ハイブリッドフタロシアニン誘導体内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性配位子を含有する、金属含有ハイブリッドフタロシアニン誘導体。

124. A) (1) 所望の励起ピークを有する少なくとも1のドナーサブユニット; (2) 所望の放射ピークを有する少なくとも1のアクセプターサブユニット; (3) 少なくとも1の電子伝達サブユニット; および (4) ハイブリッドフタロシアニン内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性配位子を有し、該ドナーサブユニットからアクセプターサブユニットへの分子内エネルギー伝達が可能である; 少なくとも1の金属含有ハイブリッドフタロシアニン誘導体を選択する、B) 該フタロシアニン誘導体を微粒子内へ取り込ませる: 工程を含む方法にて作成される微粒子。

125. ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソームおよびコロイドからなる群から選択される、請求項124記載の微粒子。

126. フタロシアニン誘導体内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性リガンドを含有する、金属含有フタロシアニン誘導体を含む微粒子。

127. ハイブリッドフタロシアニン誘導体内の金属に共有結合している少なくとも1の軸性リガンドを含有する、金属含有ハイブリッドフタロシアニン誘導体を含む微粒子。

134. A) 色素系中に、所望の励起ピークを有する少なくとも1の出発のドナーサブユニット、および所望の、互いに同一もしくは非常に近接している放射ピークを有する2またはそれ以上の最終アクセプター色素を含有し、該色素系の各色素が励起エネルギーを最終のアクセプター色素へ伝達する有意なエネルギー伝達を十分行えるようなスペクトルの重複を有するように、一連の色素系を選択する; そしてB) 該一連の色素系を微粒子内へランダムに取り込ませて最小の蛍光消光と最大の蛍光強度を示す改良された粒子となるようにする: 工程を含む製法にて製造される、改良された蛍光微粒子。

135. 該放射ピークが互いに10nmの範囲内にある、請求項134記載の改良された微粒子。

136. 該一連の色素系に5個までの異なる色素を含有する請求項134記載の改良された微粒子。

137. 該一連の色素系に10個までの異なる色素を含有する請求項134記載の改良された微粒子。

138. a) カルボシアニン色素およびエテニル置換ジピロロメテンボロンジフルオロ色素からなる群から選択され、所望の励起ピークを有する少なくとも1の出発ドナー色素、および、フタロシアニン類からなる群から選択され、所望の放射ピークを有する少なくとも1の最終アクセプター色素を含有し、色素系中の各色素が励起エネルギーを最終アクセプター色素へ伝達するのに十分なスペクトルの重複を有しており、ストークスシフトが50ナノメートル以上である色素

系を選択し；b) 該一連の色素系を微粒子内にランダムに取り込ませる：工程を含む方法で製造される蛍光微粒子。

139. A) 所望の励起ピークを有する少なくとも1の出発ドナー色素、および所望の放射ピークを有する少なくとも1の最終アクセプター色素を含有し、色素系中の各色素のスペクトルが励起エネルギーを最終アクセプター色素へ伝達するのに十分であるよう重複しており、該微粒子の励起波長が、試料の吸収が入射光の約10%以下である領域内であり、試料の蛍光の寄与が、バックグラウンド信号の約10%以下であるような一連の色素系を選択し、B) 該色素系をランダムに微粒子内に取り込ませる：工程を含む方法で製造される、少なくとも1のアナライトを、該アナライトを含有することが予測される試料内から検出するための蛍光微粒子。

140. 試料が生血清、生の尿及び生の血漿からなる群から選択される、請求項139記載の微粒子。

141. A) 励起波長が、試料の吸収が入射光の約10%以下であり、放射が試料の蛍光バックグラウンド信号に対して10%以下となる領域であるよう選択された所望の励起ピークおよび放射ピークを有する、ハイブリッドフタロシアニ

ン誘導体を選択し；B）該一連の色素を微粒子内にランダムに取り込ませる工程を含む方法で製造される、試料中の少なくとも1のアナライトを検出するための蛍光微粒子。

142. 該試料が生血清、生の尿および生の血漿からなる群から選択される、請求項141記載の微粒子。

143. シリコン〔ジ（1，6-ジフェニルナフトロシアニン）〕ジフトロシアニンビス（ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド）。

144. シリコン〔ジ（1，6-ジフェニルナフトロシアニン）〕テトラフルオロフトロシアニンフトロシアニンビス（ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド）。

145. シリコン〔ジ（1，6-ジフェニルナフトロシアニン）〕テトラフルオロフトロシアニンフトロシアニンビス（ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド）。

146. シリコン〔ジ（1，6-ジフェニルナフトロシアニン）〕ジフトロシアニンビス（ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド）。

147. シリコン〔ジ（1，6-ジフェニルナフトロシアニン）〕ジ（第3ブチルフトロシアニン）ビス（ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド）。

## 【発明の詳細な説明】

新規化合物を用いた粒子内における蛍光エネルギー伝達  
および分子内エネルギー伝達

本発明は、1994年6月12日に出願された米国特許出願第08/274,535号の一部継続出願であり、1993年10月18日に出願された米国特許出願第08/138,708号、1993年9月24日に出願された米国特許出願第08/126,367号に優先権主張をしている。上記全ての出願は、本明細書に参考として含まれる。

発明の分野

本発明は一般に、新規な色素と標識、および検出物の検索もしくは可視化に関する。さらに詳細には本発明は蛍光エネルギー伝達および分子内エネルギー伝達をイムノアッセイまたは核酸アッセイにおけるアナライトの検出のために利用すべく、蛍光色素を含有する蛍光ラテックス粒子を提供する。

発明の背景

細胞または細胞内の分子を可視化するため、および流体中のアナライトの濃度を測定するために様々な方法が使用される。蛍光顕微鏡を使用する場合には蛍光色素、一般には抗体のごとき特定のプローブに結合している蛍光色素を、細胞内のタンパク質および複合体の局在を調べるために用いる。アナライトの濃度の測定には最近40年間で、抗体のアナライトもしくは標的リガンドに対する優れた特異性からイムノアッセイが一般的となっている。ラジオイムノアッセイは、放射線標識化したヌクレオチドのアナライトに対する高い特異的活性に基づいて開発され、これによって低濃度のアナライトの測定が可能となった。しかしながら、環境およびヒトの健康への影響が考慮され、イムノアッセイにおける放射性物質の使用は一般的ではなくなってきつつある。イムノアッセイの信号を増幅するために酵素を使用することは、酵素が環境またはヒトの健康に対して害を及ぼさな

い、もしくはその危険性が無いという点において、イムノアッセイの分野における重要な進歩であった。酵素を使用するイムノアッセイはしかしながら、酵素の活性が温度依存性であり、酵素もしくは基質の不安定性によって標的リガンドの

定量が不正確となるという問題を抱えている。イムノアッセイにおいてその他の方法としては、酵素の存在下もしくは非存在下で、蛍光をアナライトの濃度の測定のための信号としてモニターすることが行われている。

生物流体内のアナライトの濃度を定量する際に、蛍光色素の性質は非常に重要である。例えば、生物流体が血液、血清もしくは血漿である場合、流体固有の蛍光により、多くの色素が使用できなくなる。生物流体を、200 nm以上の様々な波長において励起すると一般には600 nmまでの蛍光放射を示す。蛍光は色素を適当な波長によって励起させることによって発光する。蛍光信号は、特定の波長で蛍光分子を励起させ、そして他の波長における蛍光の放射を測定するように調整された蛍光計測器を用いて測定する。励起波長と放射波長の相違は、ストークスシフト (Stokes shift) として認識される。最も感受性の高い測定を行うためには、試料の放射波長が色素の放射と干渉するものであってはならない。さらに、ストークスシフトを可能な限り大きくして、励起光がバックグラウンド信号として検出器に検出されることのないようにする必要がある。ストークスシフトが大きい場合には、蛍光メーター内のフィルターもしくはモノクロメーターを、放射波長近辺の光を除くために使用してもよい；しかしながら、フィルターを使用すると、検出器へ届く光量が減少する。この光のロスという問題を回避する方法のひとつとして、一般的な高明度の光源を用いるという方法がある。小さなストークスシフトおよび生物流体の固有放射に近い値の放射を示す色素に関する問題を除くため、一般に精巧な装置が構築されている。病院における、患者近傍での診断の出現に伴い、診断に使用する装置はより小型化され、そしてより使用が簡単なものとする傾向がある。従って、生物試料中のアナライトを検出するイムノアッセイにおいて、蛍光の発光を評価し得る、小型で単純な蛍光計の開発が所望されている。

固有の蛍光を有する、流体中のアナライトのアッセイもしくは細胞成分の可視化において生じる他の問題は、標識として用いられる色素の選択である。色素は一般に、その明るさ（蛍光量子収量の生成および吸光係数）によって選択される、というのは、一定の感受性がアッセイもしくは可視化操作において必要とされ

るからである。しかしながら、試料が固有の蛍光を有する場合には装置が試料の蛍光を色素からの蛍光と区別できないおそれがあるため、標識として使用する色素の選択が制限される。

本発明は、特定の励起および放射波長に調整し得る増幅された蛍光標識系を開発する方法を提供する。さらに、本方法は色素を粒子中に取り込ませて、蛍光の消光を最小限に抑制し、粒子中の色素分子の蛍光強度を最大にする改良方法を提供する。本発明の新規な色素系は、流体内のアナライトの量、および特に生物流体内のアナライトの量を測定するのに有用である。本発明の新規色素系は、特定の励起および放射波長に調整することができ、これによって例えば光放射ダイオードおよびレーザーダイオードのごとき低電流の光源およびホトダイオードやその類似物のごとき検出器を用いた、例えば患者近傍での診断に供するイムノアッセイに用いるためのバッテリー電流で小型の蛍光計を作成し得る。

#### 発明の概要

本発明は、新規な蛍光粒子に関する。この新規な粒子は、特定の励起および放射波長に調整して広く様々なアッセイまたは可視化系に用い得る。他の点において、本発明の提供する方法論は、色素分子の粒子内部における蛍光の消光を最小限にし、蛍光強度を最大限とするために、励起波長および放射波長が同じもしくは非常に近似している別個の色素分子を使用して色素を粒子内へ取り込ませる、改良方法をも開示する。

新規なフタロシアニン誘導体およびハイブリッドフタロシアニン誘導体を開示し、これらの化合物に関して特許を請求している。少なくとも1つのハイブリッドフタロシアニン誘導体を有する微粒子であって、該誘導体は(1)所望の励起ピークを有する少なくとも1つのドナーサブユニット；および(2)所望の放射

ピークを有する少なくとも1つのアクセプターサブユニットを有しており、該誘導体は該ドナーサブユニットから該アクセプターサブユニットへの分子内エネルギー伝達を行うことができるという態様を開示する。かかる誘導体はまた、電子伝達サブユニットを含有していてもよい。軸性配位子がハイブリッドフタロシアニン誘導体に含有されている金属に共有結合していてもよい。分子内エネルギー

伝達が可能である多くの化合物を、蛍光エネルギー伝達が可能である化合物と同様に特許請求の範囲としている。

#### 図面の説明

図1はフタロシアニン、ナフタロシアニンおよびアントラニロシアニンの構造を示す。

図2はシリコンフタロシアニン、シリコンナフタロシアニンおよびシリコンアントラニロシアニンの構造を示す。

図3はシリコンフタロシアニンジヒドロキシドのスペクトル図および2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシドのスペクトル図である。

図4はエテニル置換ジピロロメテンボロンジフルオロ色素の一般的構造の図である。

図5は波長増加に対するバックグラウンド信号の減少を示す図である。本データは本出願人が1992年5月21日に提出した米国特許出願第07/887,526号の「試薬の移動を膜無しで制御する診断装置」に記載の測定装置にて測定したものである。なお、該出願の全体は本明細書に参考として含まれる。

図6は近赤外に放射を示すナフタロシアニン誘導体である。

図7は蛍光エネルギー伝達ナフタロシアニン化合物の一般式を示す。

図8はヒト血清の200nmから1000nmの吸収スペクトルを示す。

図9は新規ハイブリッドフタロシアニン誘導体である、シリコン[ジ(1,6-ジフェニル-ナフタロシアニン)]ジフタロ-シアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)を示す。

#### 詳細な説明

本発明は新規蛍光粒子および新規蛍光分子およびこれらを用いた診断方法を提供する。蛍光色素を利用した細胞成分もしくは細胞の可視化、または蛍光色素を用いるアッセイおよび試料中のアナライトを定量するアッセイの開発には蛍光計の使用が必要である。蛍光標識、試料および装置は、正確な測定のためお互いに許容性であることが必要である。試料および装置に応じた、蛍光標識をするためのいくつかの基準を以下に示す。第1に、色素の吸収もしくは励起および放射



波長は、標本または試料に一致してはいけない。第2に、色素のストークスのシフトは励起波長からのバックグラウンド値を最小にするために、可能な限り大きくすべきである。第3に、色素は可視化させる相またはアッセイの流体相と相溶性でなくてはならない；すなわち、色素は可視化もしくはアッセイ条件に応じて水溶性または水不溶性であるべきである。第4に、色素は所望の感受性を達成するために必要な明るさを有すべきである。明るさは色素の吸光係数および蛍光量子収量により決まる。第5に、蛍光信号を検出するための装置は一般に、色素の特異性および可視化もしくはアッセイしようとする標本もしくは試料の特異性に合わせてデザインする。

これらの点をより詳しく説明し、さらに蛍光可視化手法または蛍光色素を用いたアッセイ法を開発する際の問題点にも言及する。一つは、色素としてはすでに合成されているか、または上記基準に合致させるために合成したものに限定されることである。当業者は、広い範囲の励起および放射波長を有する色素分子のデザインおよび合成が非常に長期間かかり、一般には非常に限定された範囲の励起および放射波長のみを目的とした分子のデザインがされていることを認識するであろう。本発明の開示するところは、多くの励起および放射波長に調整し得、大きなストークスシフトを得ることのできる蛍光標識を製造することを可能にするものである。すなわち、色素に対応する装置をデザインするのではなく、色素系を試料もしくは標本および装置の特性にあわせてデザインすることが可能である。色素系を試料および装置の特性に適應させるように調整することにより、可視化操作またはアッセイの成功の機会が多いに増やされる。

色素の励起および放射波長はアッセイもしくは可視化しようとする試料と一致すべきではない、というのは一致させれば試料が蛍光信号の測定を干渉するからである。試料の吸収または放射波長が色素と同じであれば、実際には、例えば血清または血液試料を希釈して試料による干渉を減少させるか、または干渉している試料を検出領域から洗浄、排除することになる。実際、現在の市場には、生の生物流体内のアナライトの測定、特に生の血液または血清の測定を行う蛍光アッセイ系は販売されていない。生の試料内のアナライトを検出するための蛍光アッ

セイ系が無い理由は、上記に述べた全ての問題を解決する色素が、特に生物試料の蛍光測定法においては無いことによるものである。励起波長において、試料が有意な吸収をする場合、試料を励起する光量は、試料の性質の相違によって影響を受ける。例えば、異なる個人から血清、血漿または血液試料を採取した場合、各試料は励起光に対する比吸収が異なり、この相違は蛍光標識を励起するのに用いた励起光の強度の相違へと翻訳される。色素の蛍光放射は、直接入射光の強度に比例し、試料が入射光の一部を吸収する場合には、蛍光信号はそれによって変化する。これによって、不正確なもしくは影響を受けた蛍光放射を測定するという結果となる。さらに、色素の放射波長は試料の放射もしくは吸収と一致してはいけない、というのは、試料が色素の蛍光によって測定される蛍光を増加させ、そしてその結果、不正確もしくは影響を受けた蛍光放射が得られることになるからである。これらの問題は、試料が励起および放射波長に対して不可視である場合には除くことができる。

図8には200nmから1000nmのヒト血清のスペクトラムを示す。600nm以上の波長の吸収は200nmから600nmの間の吸収よりかなり少ない。従って、入射光の吸収および色素の蛍光に及ぼす影響は600nm以上で励起すれば減少できる。尿、血液、血清もしくは血漿を含む生物流体に対して好ましい励起波長は600nmまたはそれ以上である、特に好ましい600nm以上の励起波長は、レーザーダイオードおよび光放射ダイオードの最高放射波長に一致する。好ましい放射波長は600nm以上から選択する。試料固有の蛍光は色

素および試料の放射波長が重複する場合に高いバックグラウンド信号となり得る。加えて、励起源の散乱光もまた、バックグラウンド信号となり得る。散乱光のバックグラウンドに対する寄与は、例えば図5から認められる。一般に、散乱の大きさは測定された波長の4乗に対する逆関数となる。このことは、所望の放射波長はスペクトルの近赤外または赤外領域にあることを意味する。本明細書では600nm以上の波長で励起し、650nm以上の放射および、より好ましくは730nm以上で放射する色素および色素系を開示する。

励起源からのバックグラウンド値を最小にして、感度の限界におけるバックグ

ラウンドに対する信号の割合が最大となるべく、色素のストークスシフトは可能な限り大きくすべきである。大きなストークスシフトはしかしながら、蛍光の測定効率を最大とするだけで、常に蛍光測定の正確さに結び付くわけではない。例えば、表3は420nmから670nmの波長で励起された、バッファー中または希釈していないヒト血清中におけるいくつかの色素系のデータを示す。血清中の第1の色素系を475nmで励起した場合の蛍光強度(表1、1行)は、ストークスシフトが205nmであってもバッファー中の色素の場合のたった7.6%である。420nmで励起した第2の色素系(表1、4行)は、ストークスシフトが260nmで、バッファー中の場合の28%である。第3および第4の色素系(表1、60行および59行)は、670nmと650nmで励起した場合に、それぞれ110nmと130nmのストークスシフトを示し、蛍光強度はバッファー内および血清内においてほぼ同等であった。第5の色素系は、ハイブリッドフタロシアニン誘導体であり(表1、1行)、646nmで励起した場合に、ストークスシフトが114nmで、バッファー内と血清内ではほぼ同等の蛍光強度を示した。励起波長が測定を行った試料の吸収範囲である場合に、蛍光強度が大きな影響を受けることをデータは示している。データはまた、ストークスシフトが測定の正確さには影響を及ぼさないことも示している。これらのデータは、試料の吸収のある範囲内の波長で励起される他の色素および色素系にもあてはまる。減少した蛍光放射の効果は放射光の波長(すなわち、680nmまたは78

0nm)によるものではない、というのは、血清およびバッファー溶液の680nmおよび780nmにおける吸収が最小であるからである。当業者は、本明細書に記載した発明の開示、すなわち、色素系の励起および放射のための波長は、大きなストークスシフトを有する色素系を選択するだけより、試料の吸収および放射の性質に拘わるものであるということを認識するであろう。100nm以上のストークスシフトを示す色素の入手可能性は限られており、特に励起波長が600nm以上のものの入手は非常に困難である。大きなストークスシフトを示すほとんどの色素が水不溶性であるため、色素の水性試料への溶解性がさらに入手

可能な色素であってもその利用性が問題となる。

小さなストークスシフトを有する色素の問題は、モノクロメーターまたは、励起源からの光を透過させる高価な光学製品を用いることによる蛍光メーターの機械的な操作により通常、克服し得る。しかしながら、フィルターに起因する光の強度の減少に対応するために、例えばより強力な光源の使用が必要となる。光源は熱を発生し、これは熱溝もしくは熱ファン等の装置を使用して消散させる必要がある。光学的小よび機械的観点からの蛍光測定装置の複雑さは、色素系の不十分さに大きな影響を及ぼす。病院および救急分野における患者近傍での試験の出現によって、イムノアッセイにおける蛍光を測定する装置はより小型で、そして技術者に対してより難しくないものにする必要がある。すなわち、例えばイムノアッセイに用いられる蛍光メーターを製造する業界では、将来的にはさらに単純で小型の装置が必要とされるのである。高出力光源および高価な光学製品が現在では蛍光メーターに搭載されているが、これは小さく、小型な装置という要求にはそぐわない。本発明は、大きなストークスシフトを有し、両方の波長が励起源および放射検出器の両方に適合するように調整されている色素であって、試料、例えば血液、血清、血漿、尿、地下水およびこれらの類似物の吸収および放射波長と共存し得る色素を開示する。新規蛍光粒子の励起および放射波長は一般に、お互いにそれぞれ独立して変化させ得る。

色素はアッセイの流体相と相溶性でなくてはならない、または換言すれば、色

素は可視化操作もしくはアッセイの方法に応じて水溶性または水不溶性でなくてはならない。多くの蛍光色素は水不溶性であるかまたはほとんど水に溶けない。従ってこれらの色素は分子、タンパク質、核酸または細胞の標識には不向きである。当業者は、水不溶性色素がラテックス粒子の中へ導入し得ることを、米国特許第4,326,008号、第4,609,689号および第5,154,887号の記載から認識するであろう。これらの特許は本明細書に参考として含有する。即ち水不溶性色素をラテックス粒子の内部に取り込ませることによって、様々なアッセイ方法における可視化用ラテックスとして有用とすることができる。

色素は、所望の感受性を得るのに必要な程度に明るいことが必要である。色素

の励起係数と蛍光量子収量、および測定する標的の濃度がわかれば、色素が所望の感受性を達するのに十分明るいか否かを判断することができる。ラテックス粒子内への色素の取り込みまたは蛍光基質の産生を触媒する酵素の利用は、当業者が増幅系として用いる技術の例である。

蛍光信号を検出するために用いられる装置は一般に、色素および可視化またはアッセイしようとする標本もしくは試料の特性に応じてデザインされる、というのは限られた数の色素しか良好な使用ができないからである。上記のように、装置の構成成分は特定の色素系に応じて選択される、というのは、有用な装置は励起源からの光を除くように高度に調節されている必要があるからである。

上記に記載した各条件を共に考慮すると、ピコモル以下の濃度の試料の分析、特に生物流体試料の分析に用い得る色素系の開発の幅が非常に狭まることがわかる。蛍光を測定する装置のデザイン上の制約からも、かかる制限は発生する。本発明の開示する新しい事項によれば、一般的にはほとんどすべての装置のデザインに適合する色素系をデザイン、合成および調節することができる。

本発明の開示する事項のうちのいくつかは、色素の励起および放射波長を、この励起および放射が、蛍光を測定する試料のマトリックスに対して許容性であるように、および蛍光を定量する装置に対して許容性であるように調節するための方法に関することである。ひとつの開示は、対となって蛍光エネルギーの伝達が

生じる少なくとも2種類の色素を粒子内部もしくは粒子表面上へ取り込みまたは吸収のいずれかをさせることである。使用し得る粒子は、粒子の表面もしくは内部に色素を吸収したものである。他の開示は、お互いに共有結合しており、溶液内および粒子内の両方において蛍光エネルギー伝達を生じる色素を取り込ませることである。その他の開示はハイブリッドフタロシアニン類、ハイブリッドナフタロシアニン類、ハイブリッドアントラニロシアニン類およびこれらのクラスの化合物の誘導体を取り込ませることである。

粒子内に取り込ませるための色素対の選択は、ドナー色素の適当な励起波長におけるエネルギー伝達を示す能力（シングレット-シングレットエネルギー伝達）およびアクセプター色素の放射波長に基づいて行う。2つの分子の蛍光エネルギー

ギー伝達は、当業者には良く知られており、エネルギー伝達の速度はフォースターによってアン・フィジック (Ann. Physik. ) (1984) 2、55-75に報告されている。蛍光エネルギー伝達は、タンパク質、RNAおよびペプチド内でのおよその関係を知るための分光学的基準として用いられ (アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (1978)、47、819-846)、その他粒子内の幾何学的な詳細を探索するのにも用いられる (フィジカル・レビュー・レターズ (1988) 61、641-644)。米国特許第5,326,692号は、制御可能な強化されたストークスシフトを有する蛍光粒子を開示する。米国特許第4,542,104号および第4,666,862号は、フィコビリタンパク質 (phycobiliproteins) 内の蛍光エネルギー伝達を開示する。これらの色素複合体はイムノアッセイにおける標識として使用するよう、開示されている；しかしながら、フィコビリタンパク質の制限された利用性および天然タンパク質複合体が高価であるため、これらのタンパク質は商業的規模で利用するのに好ましいとは言えない。非対称またはハイブリッドフタロシアニン類は例えば、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー1990、112、9640-9641；ケミストリー・レターズ1992、2031-2034およびインオーガニック・ケミストリー1994、33、1375-1740に記載されているが

しかし、本発明は好ましい蛍光強度を達成し、所望の励起および放射性質を有する、免疫診断において用いるために合成される強力な化合物を開示する。本発明はさらに、様々なジイミノイソインジリンまたはジカルボニトリルの前駆体の比率およびハイブリッドのフタロシアニン類、ナフタロシアニン類およびアントラニロシアニン類を合成する際における該前駆体の電子供与性基もしくは電子吸引性基による置換の比率が、化合物の吸収スペクトルおよび励起および放射波長に影響を及ぼすことを開示する。

ある点から言えば、本発明の粒子はその内部もしくは外部上にエネルギー交換距離にて存在する少なくとも2種の色素を有する新規な蛍光粒子である。当業者は、ラテックス、シリカ、アルミナ、リボソーム類、様々なコロイドおよびこれ

らの類似物等の様々な粒子が本発明に利用し得ることを認識するであろう。特に好ましい粒子はラテックス粒子である。粒子中に取り込ませるための色素分子の選択は、使用する粒子、分析しようとする試料および蛍光を測定する装置によって定まる。例えば、血清や細胞抽出物のごとき生物媒体中のアナライトを測定するアッセイを開発する際には、試料の固有の吸収および蛍光を考慮しなくてはならない。血清および細胞構成成分の吸収は、600 nm 周辺までの可視スペクトル内と同様、紫外線スペクトルにも存在し、固有の蛍光は大まかには600 nm 近くである。さらに、小さな粒子、例えば地下水中の土粒子、血清もしくは血液中のリボタンパク質、細胞および細胞の粒子と構成成分、を含有する試料では励起光が散乱され、その結果、より高いバックグラウンド値が生ずることとなる。理想的な色素の組は、600 nm 以上で励起されもしくは吸収し、そしてアクセプター色素が吸収する波長を放射するドナー色素と、600 nm 以上の波長で放射するアクセプター色素からなる。単一の色素系でも、例えばハイブリッドフタロシアニン誘導体を使用した場合は励起および放射波長は両方、600 nm 以上であるべきである。例えば血清である試料は、このようにすればアクセプター色素の蛍光に影響を及ぼさなくなる、というのは、試料はドナー色素の吸収領域においてほとんど吸収を示さず、そしてアクセプター色素が試料が蛍光を有さない領域の波長にて放射するからである。

粒子の内部もしくは外部に取り込まれた蛍光色素分子は、各色素がお互いに非常に近接しており、および粒子のマトリックスに対しても非常に近接しているため、蛍光消光を示す。粒子の内部および外部に色素を取り込ませる際に、色素の濃度は消光を考慮に入れて定めるべきである。複数の色素は、連続的にあるいは同時に取り込ませればよい。消光の程度は、バッファー溶液、緩衝タンパク質溶液または水中に希釈（約0.001から0.1%の固形量）した粒子懸濁液の蛍光放射を測定し、その後色素を遊離させる溶剤にて上記と同濃度となるように粒子を溶解した溶液の蛍光を測定して、定量する。蛍光強度の比率（ $1 - \left[ \text{取り込まれた色素の蛍光強度} / \text{遊離された色素の蛍光強度} \right]$ ）は、粒子内における消光の程度を示すものである。実際には、様々な濃度で色素を取り込ませ、取り込

れた色素およびこれから遊離された色素の蛍光強度を測定して粒子の蛍光強度を最適化し、一方で粒子内の蛍光の消光を最小にする。1以上のアクセプター色素を蛍光消光を最小にし、蛍光強度を最大にするために使用する状況下においては、お互いの放射ピークが約10nmの範囲内にある別個のアクセプター色素を選べばよい。他の考慮すべき重要な点は、蛍光エネルギー伝達の効率である。実際には、エネルギー伝達効率は100%に近いものではなく、エネルギー伝達の後にもドナー色素の蛍光が観察される。この結果放射されるドナー色素からの蛍光は、粒子の「有効ストークスシフト (effective Stokes shift) (すなわち、蛍光系における、規定されたアクセプター分子の放射波長と光源波長の波長の相違の最小値)」がドナーとアクセプター色素の、それぞれ励起波長と放射波長の相違ではなく、ドナーの放射波長とアクセプターの放射波長の間の相違となってしまう。効果的なエネルギー伝達を得られず、蛍光メーターにて使用するフィルターの選択が困難な場合にはドナーとアクセプターの放射波長は、お互いに部分的に重複していても良い。エネルギー伝達効率の減少はまた、直接アクセプター色素の放射の減少につながり、粒子が効果的なエネルギー伝達を有する粒子ほどには明るくない粒子となる。さらに、非効果的エネルギー伝達条件下においては、試料ま

たは溶液の条件、例えばpH、イオン強度および類似の条件のわずかな変化が、エネルギー伝達効率の強度に影響を及ぼし、このため蛍光信号の強度が影響を受ける。

蛍光エネルギー伝達のための色素の対を選択するにあたって、ドナーの放射波長およびアクセプターの励起波長の重複を研究する。各色素は粒子内においてお互いエネルギー交換距離に保持してシングレット-シングレットエネルギー伝達が可能なようにする。受入れ可能な励起および放射波長の重複を示す色素の特定の組(例えば、*プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー* 1969、63、23~30参照)であっても、これらが粒子内で蛍光エネルギー伝達を示さず、または最適以下(80%未満)のエネルギー伝達効率しか有さないものかもしれない。2またはそれ以上の色素が効果



的なエネルギー伝達を示すかどうかは、適当なスペクトルの重複基準が満たされた後に実験によって判断する。蛍光エネルギー伝達の効率、ドナー色素単独の粒子の蛍光強度を測定し、さらに2またはそれ以上の色素を取り込んだ粒子（すなわち、蛍光エネルギー伝達粒子である）の、ドナー色素の放射波長における蛍光放射を測定して評価するが、その際、両方の粒子は同じドナー色素および粒子の濃度が等しくなるようにする。ドナー色素放射波長において測定されたエネルギー伝達粒子からの蛍光を、ドナー粒子からの蛍光で除いたものが蛍光エネルギー伝達の効率である。有効ストークスシフトがドナー色素の放射により減少されぬよう、理想的には該粒子のドナー色素からの放射は検出不可能であるかまたはほとんど検出できないものであるべきである。好ましい蛍光エネルギー伝達効率は80%またはそれ以上であり、特に好ましい蛍光エネルギー伝達効率は90%またはそれ以上である。

本発明は消光が減少し、蛍光強度が改善された粒子を提供する。蛍光分子の大部分は芳香族性を有する。すなわち $4n + 2p\pi$ 電子を有する。芳香族性に起因して分子の積層、特に水溶液中の水不溶性分子もしくは水溶液中の粒子内の分子の積層が促進され、これによって蛍光消光が促進される。本発明に記載した新規

蛍光粒子は、色素分子の立体的干渉によって、最小となった粒子内積層を有する。他の観点からすれば、本発明では色素分子の蛍光消光を、ほぼ同じ励起波長および放射波長を有する別個の色素を用いることによって最小とする。すなわち、別個の色素の最大励起および／または放射の波長はお互いに約10nmの範囲内にあり、このため、実質的にこれらのピークが重なる。当業者は、様々な色素系の励起および放射スペクトルの幅を変えることができることを認識するであろう。別個の色素は基本的に、同一色素の場合のように同じ角度に組織された方向に互いに積層されることはない。この積層原理の類型としては、不純物によって純粋化合物の融点が下落することが挙げられる。固形化合物に不純物が含まれるとその不純物が純粋化合物の結晶構造を破壊することによって、融点が下がることは、物理化学者には良く知られていることである。色素を粒子の内部もしくは表面上に有機溶媒用いて取り込ませ、その後に溶媒を飛ばして色素を粒子内に析出

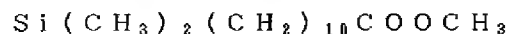
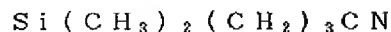
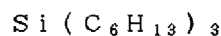
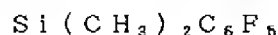
もしくは結晶化させる。粒子中の色素分子の結晶格子の崩壊によって分子の積層が変化し、これによって消光が減少する。こうして、同じ励起および放射スペクトルを有する、同一でない色素分子が分子間の消光相互作用を減少して粒子の蛍光強度を改善するのである。

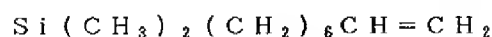
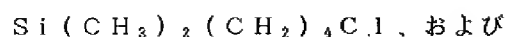
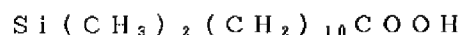
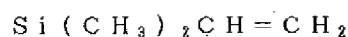
他の観点からは、本発明において粒子内で蛍光エネルギー伝達を示す別個の色素を粒子に取り込ませることは、他の結晶格子の形成をも崩壊させる。すなわち、蛍光エネルギー伝達を示す粒子の蛍光強度は、同一色素の積層が、同一でない色素により崩壊させられることによる粒子内の消光の減少によって増強される。

本発明のさらに他の観点においては、フタロシアニン誘導体および、軸性配位子を有するハイブリッドフタロシアニン誘導体の合成が、芳香族環系の積層を減少し、分子間の相互作用を最小として、蛍光強度を最大にすることを示す。

当業者は、蛍光エネルギー伝達を示す1以上の色素の対を粒子内部もしくは表面に取り込ませると、様々な波長において蛍光を発する粒子が得られることを認識するであろう。さらに、本発明の教示によれば、吸収体であるドナーから中間体ドナーへ、そしてアクセプター（これが蛍光を発する）へのエネルギー伝達力スケードを生じる3またはそれ以上の色素を同時に粒子内に取り込ませると、非常に長いストークスシフトの生成物が得られ、励起および放射の性質の多様性においてほぼ限らない粒子を得ることが可能となることを認識するであろう。

図1はフタロシアニン類、ナフタロシアニン類およびアントラニロシアニン類誘導体である好ましいアクセプター色素を示す。図2は特に好ましいアクセプター色素である、シリコンフタロシアニン類、ナフタロシアニン類およびアントラニロシアニン類の誘導体を示し、式中のRは水素または0~20のヘテロ原子（N, O, S）を有し、0または1のシロキシド基を有する1~20炭素原子の飽和もしくは未飽和アルキル炭素鎖を示す。最も好ましい化合物の態様は、Rが





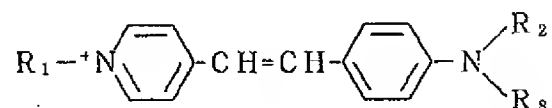
であるものである。フタロシアニン類およびナフタロシアニン類の親化合物は、ラテックス粒子内におけるその放射波長がそれぞれ680 nmおよび780 nmであることから好ましい。好ましい親化合物としては、850から900 nm付近の放射を示すアントラニロシアニン類もある。これらの親化合物の3つの種類は総合して「フタロシアニン誘導体」と呼ばれ、金属を含有していてもしていなくてもよく、そして軸性配位子を有していてもいなくてもよい。フタロシアニン誘導体の放射波長は特に生物試料中の蛍光を定量する際に、そしてバックグラウ

ンドの散乱光強度を最小とする際に有用である。当業者は例えばフェニル、ナフチルまたはアントラニル環に様々な置換基を付した別個の分子ではあるがフタロシアニン類の誘導体である化合物を合成し得、これがさらに本発明の範囲内であることを認識するであろう。テトラアザポルフィンの誘導体もまた、本発明の誘導体の範囲内である。芳香族骨格を誘導体とすると、励起もしくは放射波長が赤または青側にシフトする。フタロシアニン誘導体色素を励起させるためのドナー色素の選択は、フタロシアニン誘導体の適当な範囲の吸収波長に対応する放射波長をドナー色素が有するようにして行う。図3はシリコンジヒドロキシフタロシアニンおよびシリコンジヒドロキシナフタロシアニンのジメチルホルムアミド溶液の、吸収スペクトルを示す。これらのアクセプター色素が、ドナー色素によって強く励起される範囲はそれぞれ、およそ550 nmと670 nmおよび600 nmと760 nmの間である。当業者は、多くの色素がドナー色素の候補となり得ることを認識するであろう、というのは、アクセプター色素を励起させ得るのに有用な波長範囲が広いのためである。アクセプターの選択は上記に概略を示した基準に基づいて行わなくてはならない。いくつかの実施例はこの新規なアプローチの可転性を説明するものである。装置を構築すると仮定すると、最大強度が480 nmである励起源と、600から700 nmの間で良好な量子効率を示す

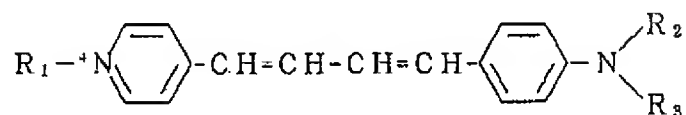
検出器を有するものとなる。ドナー色素は従って、480 nmにて励起され、さらにフタロシアニン誘導体が680 nmの放射に対するアクセプター色素であると仮定すればドナーは550から670 nmの放射を示さなくてはならない。

本発明において好ましい色素の種類は、スチリル、フェニルブタジエニルおよびフェニルヘキサトリエニル色素である。スチリル色素は、以下の構造を有する

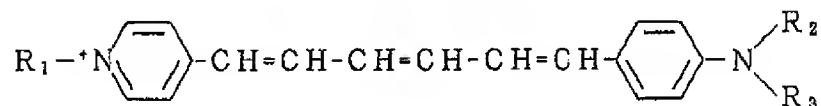
:



フェニルブタジエニル色素は、以下の構造を有する:



フェニルヘキサトリエニル色素は以下の構造を有する:



(式中 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は同一でも異なってもよく、 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は水素または0から10のヘテロ原子を有する、飽和もしくは未飽和の1~20炭素原子のアルキル炭素鎖を示す。)

一般的に、これらの種類の色素は、およそ約470と530 nmの間の励起波長と、およそ600から780 nmの間の放射波長を有する(リチャード・ピー・ホーランド著、モレキュラー・プローブス・ハンドブック・オブ・フルオレセント・プローブス・アンド・リサーチ・ケミカルズ 1992-1994、第156頁参照)。特に好ましいスチリル色素は、トランス-4-[4-ジブチルアミノ]スチリル]-1-メチルピリジニウムヨード(アルドリッチ・ケミカル社)であり、これはジメチルホルムアミド溶液とした際に486 nmにおいて最大吸収を示し、そして放射が600 nmである化合物である。当業者は、こ

これらの種類の色素のアニリン窒素およびピリジン窒素以外の置換基は、水不溶性を維持するために疎水性基であることが必要であることを認識するであろう。

本発明の新たな技術の他の適応においては、装置は最大強度が420nmである光源と上記例にて述べた検出器を有するよう組み立てる。色素系にはフタロシアニンアクセプターを含有してもよい；しかしながら、異なったドナーを選択すべきである。本適用において好ましいドナーは、メソーテトラ-2-アミノフェ

ニルボルフィン（ポリフィリン・プロダクツ・インコーポレイテッド、米国ユタ州ローガン）である。この化合物のジメチルスルホキシド溶液は、励起波長418nmに対して最大吸収を有し、655nm付近で放射を示す。このポリフィリンはラテックス粒子中のフタロシアニン誘導体を励起させ、そしてこの色素系は680nmを放射する。

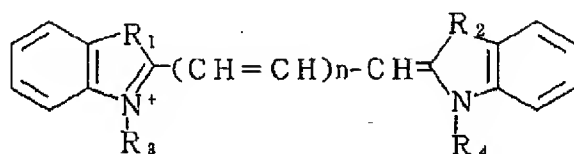
他の特に好ましい適用は、イムノアッセイを生の血液もしくは血清または様々な生物試料内で行えるようにする装置系を構築することである。励起源としては最大強度が650nm付近であるLEDまたはレーザーダイオードを使用して、血液または血清試料による光の吸収を排除する。検出器は700から800nmの間で良好な量子効率を有しており、従って好ましいアクセプター色素は約780nmの放射波長を有するナフタロシアニン誘導体である。この放射波長は血液もしくは血清または生物試料中には通常は認められない。ナフタロシアニンアクセプターに対するドナー色素は光源と一致するよう650nm付近で吸収し、およそ660nmから760nmの間で放射するべきである。このドナーとして適用するのに好ましい色素は、カルボシアニン色素およびエテニル置換ジピロメテンボロンジフルオロ色素の種類であり、これらは米国特許第5,187,288号、5,248,782号および5,274,113号に記載されている。

生の血液または血清を用いるイムノアッセイに対して、さらに他の特に好ましい適用は、励起源が790nm近辺であり、放射波長が900nm近辺とする条件である。単一色素系に好ましい色素はシリコン1、6-オクタエトキシナフタロシアニンビス（ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド）であり、これは790nmにて励起され約900nmにて放射する。

ナフトロシアニン色素およびナフトロシアニン誘導体色素に対するドナー色素として好適に用いられる色素はカルボシアニン類およびエテニル置換ジピロロメテンボロンジフルオロ色素である。これらは米国特許第5,187,288号、第5,248,782号および5,274,113号に記載されているように、790nmまでの励起波長および670nmから800nmまでの放出波長を有する。

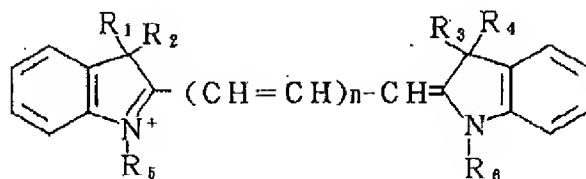
好ましいカルボシアニン色素は一般に500nmから750nmで励起され（モ

レキュラー・プローブス・ハンドブック参照）、以下の一般式で表わされる化合物である：



（式中、nは1もしくは2；または3である；式中、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>はS、NまたはOである；そして式中R<sub>3</sub>はHまたは、飽和もしくは不飽和であって0～10のヘテロ原子（N、O、S）を有する、1～20炭素のアルキル炭素鎖である。）

その他の好ましいカルボシアニン色素は、以下の一般式で表される化合物である：



（式中、nは1もしくは2、または3である、R<sub>1</sub>～R<sub>6</sub>はHまたは、飽和もしくは不飽和であって0～10のヘテロ原子（N、O、S）を有する、1～20炭素のアルキル炭素鎖である。）

好ましいドナー色素としては、エテニル置換ジピロロメテンボロンジフルオロ色素も挙げられ、これは一般に500nm以上（モレキュラー・プローブス・ハ

ンドブック参照)で励起され、図4に示した一般式を有するが、式中の $R_1 \sim R_7$ は米国特許第5,187,288号、第5,248,782号および第5,274,113号に記載されている置換基を含む。

特に好ましいドナー色素は1,1-ジヘキシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニンヨウダイドおよび(E,E)-3,5-ビス-(4-フェニル-1,3-ブタジエニル)-4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジ

アゾ-5-インダセン(モレキュラー・プローブス・インコーポレイテッド、アメリカ合衆国オレゴン州ユージーン、より購入)であり、これらのジメチルホルムアミド溶液は、最大吸収がそれぞれ642nm、645nmおよび650nmであって、最大放射が675nm、665nmおよび670nmである。これらの特に好ましい色素とナフトロシアニン誘導体を取り込んでいる粒子は、650nmの光源で励起され、そしておよそ780nmから870nmで放射する。当業者はいずれの色素の励起および放射スペクトルも正規分布を示し、このため強い蛍光を得るために励起源はドナー色素の最大励起波長に正確に一致する必要が無いことを認識するであろう。同様に、有効エネルギー伝達に到達するためにドナーの放射波長もアクセプター色素の最大励起波長と正確に一致する必要は無い。当業者はカルボシアニン類の1および3位における置換基およびジピロロメテンボロンジフルオロ色素の $R_1$ および $R_7$ 位の置換基、および環状構造の間の結合は変化させ得、この変化させた化合物もまた粒子の蛍光スペクトルを調節するのに有用であることを認識するであろう。

約800nmから1000nmまでの放射波長もまた、蛍光粒子には好ましい。この近赤外領域では光源の散乱光成分が実質的に減少して蛍光測定バックグラウンド値が下がるからである。加えて、生物試料は800nmから1000nmの間では実質的に吸収も発光もしない。試料中の特定の物質、例えば血清中のリポタンパク質、地下水中の粒子、生物試料中の細胞残渣および類似物は、散乱光を増加させてバックグラウンド値を増加させるが、散乱光の測定は800nmから1000nmの範囲において最小となる。例えば、図5は許可された出願で

ある米国特許願第07/887,526号(この出願の内容は参考として本明細書に含まれる)に記載された、生のヒト血清を含有するまたはしないイムノアッセイ装置内において、測定された光の波長が730nmから900nmへ増加するにつれてバックグラウンドの減衰を示す図である。この図は、光源が1ミリワット(mW)の670nmレーザーダイオードである場合に、900nmで測定した場合を790nmでの測定と比べるとバックグラウンド信号が5倍も減少していたことを示す。さらに、生の血清の670nmにおける励起では730nmか

ら900nmの間に有意に測定可能な蛍光は認められなかった。したがって、例えば900nm付近で放射する色素の蛍光を測定する際の、信号のバックグラウンドに対する比率は、790nm付近で放射する色素と比較すると5倍改善されるのである。780nmで放射を測定した場合の信号のバックグラウンドに対する比は、730nmで測定した場合の30倍改善される(図5参照)。信号の対バックグラウンド比を最大にすることは、分析化学の分野では一般的に要求されることである、というのは測定の感度が改善されるからである。好ましい色素は、例えばジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティー・パーキン・トランスレーション1、(1988)、2453-2458に記載されている、780nm以上で放射する化合物であり、ナフトロシアニンおよびアントラニロシアニン類の誘導体(図1)を含み、およびナフトロシアニン類は図6に記載した一般式(式中、MはSi、Ge、Al、Sn、Tiのごとき金属であり、Rは軸性配位子、シリコンを有するまたは有さないアルキルまたはアリール基(好ましい軸性部分はアルキルまたはアリールシリルクロライドから合成される)、およびXは同一でも異なってもよい電子供与性基であってアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アリールオキシ、フェニル、アルキルおよびこれらの類似物を含む。1または複数のX基の電子供与性が放射波長を、通常のナフトロシアニン化合物より赤方向へシフトさせるのである(図1)。例えば実施例26、27および28に記載した化合物は放射波長が850nm付近の色素の例である。これらの好ましい色素は、780nmにて放射する色素と比較して改善された、信号の対バックグ



ラウンド比を有する（図5参照）。ハロゲン、ニトロ、シアノ、スルフェート、カルボニルおよびカルボキシアルキルおよびこれらの類似物のごとき、励起もしくは放射波長の青方向へのシフトを生じる電子吸引性基もまたX基として用い得る。この種類の近赤外放射色素に対して好ましいドナー色素は、アクセプター色素の吸収性に対応する放射波長を有するものである。この態様に好ましい色素は、米国特許第5,187,288号、第5,248,782号および第5,274,113号に記載のエテニル置換ジピロロメテンボロンジフルオライド色素である。

ラテックス粒子中の、ドナーのアクセプターに対する好ましいモル比は約20:1から約1:20の間であり、より好ましくは約1:1から約6:1の間である。所望の蛍光強度は、ドナー色素とアクセプター色素をさまざまな比率で、様々な色素濃度にて粒子内に取り込ませ、粒子の蛍光放出を測定する実験を通して得なくてはならない。

ドナー色素とアクセプター色素の幾何学的な方向は、これらの間のエネルギー伝達に影響を及ぼすであろう。ドナー色素およびアクセプター色素は、溶液中で効率的な蛍光エネルギー伝達（FET）を示す最適な結合構造の化合物であるように合成し得る。最適化されたFET化合物はその後、粒子内に取り込ませてもよい。フタロシアニン誘導体類をこの態様においてアクセプター部分として用いることができ、フタロシアニン誘導体は電子供与性または電子吸引性基（上述）にて置換して、所望の励起および放射波長を与えるようにしてもよい。例えば、この態様に好ましいナフタロシアニン化合物は図7に記載したものである（式中、Xは水素またはアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アリアルオキシ、フェニル、アルキルおよびこれらの類似物である電子供与基であり、Dはナフタロシアニン誘導体と、ドナーとアクセプター間のエネルギー伝達が可能な距離で共有結合しているドナー色素である。本発明の教示することから、当業者はすべてのフタロシアニン誘導体がドナーまたはアクセプター色素として機能し得ることを認識するであろう。例えば、シリコンオルソオクタエトキシ（フタロシアニン）誘導体は約750nmから780nmで放射し、これはシリコンナフタロシアニン

誘導体と類似している。一般に、ドナーとアクセプター間の距離は約5オングストロームから60オングストロームであり、好ましくは5オングストロームから15オングストロームである。さらに、必要とされるFET化合物の適用に応じて、各ナフトロシアニン誘導体に1~4個のドナー色素が結合していてもよい。適当なドナー色素はアクセプター色素の吸収範囲において放射するものである。実施例29は蛍光発光性シリコンフトロシアニンFET化合物の合成を示す。表1の56番は、この化合物のラテックス粒子中の蛍光性質を示す。当業者は本発明の教示することから、多くのFET化合物を特別な励起および放射波長が要求される、様々な特定の適用のために合成し得ることを認識するであろう。

近赤外スペクトルに対して高度に可視であるという、所望のおよび予期可能な蛍光性を有する粒子を開発するための他のアプローチは、非対称またはハイブリッドフトロシアニン類、ナフトロシアニン類またはアントラニロシアニン類およびこれらの誘導体を合成することである。「ハイブリッドフトロシアニン誘導体」という語は本明細書においてはすべての種類のフトロシアニン類、ナフトロシアニン類またはアントラニロシアニン類およびこれらの誘導体の、金属および軸性配位子を含むもしくは含まない混成物（ハイブリッド）であって、テトラアザポルフィン類およびその誘導体を含む。本発明の開示する新規ハイブリッド分子は、分子内エネルギー伝達を示す。ジイミノイソインドリンまたはそのジイミノイソインドリン類の誘導体から合成したものに金属を取り込み、軸性配位子で仕上げてハイブリッドフトロシアニン誘導体を合成し得る、またはベンゼン、ナフトレンまたはアントラセン化合物それぞれのジカルボニトリル誘導体から合成したものに、様々な金属の取り込みおよび軸性配位子による仕上げを通してフトロシアニン誘導体を合成し得る。ハイブリッド分子はインオーガニック・ケミストリー(1994)、33、1375~1740に記載されたテトラアザポルフィンの誘導体を含有していてもよく、これもまた本発明のハイブリッドフトロシアニン誘導体の範囲内に含まれる。2つの別個のサブユニットからなるハイブリッドフトロシアニン誘導体の合成戦略は例えばジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー(1990)、112、9640~9641、インオーガ

ニック・ケミストリー (1994)、33、1735~1740、ケミストリー・レターズ、(1992)、763~766、ケミストリー・レターズ、(1992)、1567~1570およびケミストリー・レターズ、(1992)、2031~2034に記載されている。これらの文献は、亜鉛金属を含むまたは金属を含まない、軸性配位子を含まないハイブリッド分子の合成に言及している。ここに記載した合成アプローチを、本発明の教示することへの適用は、ジイミノイソインドリンおよびその誘導体の性質が分子の励起および放射性質を支配し、さらに軸性配位子による仕上げが粒子内の積層を減少させて消光を最小にして蛍光強度を最大とするということに基づいて行う。ハイブリッドフタロシアニン誘導体上

の軸性配位子は、水溶性化合物においても好ましい、というのは軸性配位子がハイブリッド分子と、例えばハイブリッド分子に共有結合していてもいなくてもよいタンパク質、抗体および核酸等との相互作用を最小とするからである。

本発明は3または4の別個のサブユニットを有し、大きなストークスシフトを示す新規なハイブリッドフタロシアニン誘導体を開示する。基本的には、励起は最も高いエネルギーまたは最も短い波長の吸収を示すサブユニットで起こり、放射は最も低いエネルギーのサブユニットで起こる。

ハイブリッドフタロシアニン誘導体に所望される励起および放射波長によって、ハイブリッドフタロシアニンの合成に使用されるジイミノイソインドリン誘導体およびジカルボニトリル誘導体前駆体の種類が規定される。所望される励起および放射波長は一般に試料、蛍光測定の種類および装置によって決まる。ジイミノイソインドリン誘導体前駆体とジカルボニトリル誘導体前駆体の様々な組み合わせは、赤へシフトしたまたは青へシフトした励起および/または放射波長のパターンを有するハイブリッドフタロシアニン誘導体を作成するために結合し得る。一般に、ジイミノイソインドリン前駆体またはジカルボニトリル前駆体上の電子供与性置換基、特にフタロシアニン構造のオルソ位(すなわち、図6にXとして示した、テトラアザポルフィン構造に対してオルソ位)にあるアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アリールオキシ、フェニル、アルキルおよび類似物のごと

き置換基は、励起および／または放射波長を赤へシフトさせる。反対に、電子吸引性置換基、特にオルソ位にあるハロゲン、ニトロ、シアノ、スルフェート、カルボキシルおよびカルボキシアルキルおよびこれらの類似物のごとき置換基は、励起または放射波長を青へシフトさせる。さらに、オルソ位以外のサブユニットの位置もまたハイブリッドフタロシアニン誘導体の励起および放射性を変化させる。一般にジイミノイソインドリン前駆体またはジカルボニトリル前駆体のいずれをハイブリッドフタロシアニンの合成のために選択するかは、所望されているのが金属の存在か非存在のいずれであるか、およびハイブリッド分子内の金属の種類によって決まる。例えば、ジイミノイソインドリン前駆体を合成に使用する場合には、シリコン金属をフタロシアニン誘導体構造を形成するテトラメライゼーション

ン反応の間に導入することができる。シリコンはさらにシリコンジヒドロキシフタロシアニン誘導体分子へと修飾されて軸性配位子が例えば様々なシリルクロライド試薬によって処理して添わせるようにすればよい。消光を減少させ、蛍光強度を上昇させるための軸性配位子の重要性は、フタロシアニン／ナフタロシアニン分子およびハイブリッドフタロシアニン誘導体の両方に対して明白である（実施例31参照）。軸性配位子はまた、例えば他の蛍光分子と結合させる、タンパク質、ポリペプチドもしくは核酸へ結合させる、または分子の溶解性を変化させるスルフェート、カルボン酸もしくはアミノ置換基を用いて分子の荷電を変化させるごとき、分子をさらに修飾する際にも有用である。ジカルボニトリル前駆体を使用する場合、フタロシアニン誘導体は金属無しで合成されるが、Ge、Al、Sn、Tiおよびこれらに類似する様々な金属をその後に取り込ませることができる。これらの金属はまた、金属の原子価に応じて軸性配位子と共に用いても良い。

ハイブリッドフタロシアニン誘導体の蛍光消光特性は、フタロシアニン誘導体よりも特に好ましいものである。実施例32はシリコン2,3-ナフタロシアニンビス（ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド）のラテックス粒子とシリコン[ジ（1,6-ジフェニルナフタロシアニン）]ジフタロシアニンビス（ジメ

チルヘキシルビニルシリルオキシド)を含有するラテックス粒子の消光特性を比較した代表的な例である。ハイブリッドフタロシアニン誘導体は本質的には消光を示さず、表に示したさまざまな色素充填濃度に対して、ナフタロシアニン誘導体の消光の50%までの消光しか示されない。ハイブリッドフタロシアニン誘導体を含有するラテックスの蛍光強度はフタロシアニン誘導体よりかなり強い。これは、ハイブリッドフタロシアニン誘導体の特別の性質を説明するものである。

ハイブリッドフタロシアニン誘導体を合成するためのジイミノイソインドリン前駆体またはジカルボニトリル前駆体のテトラメリゼーション反応において、対向するサブユニットが同じとなるように制御し得る。この制御は例えば前駆体の置換基として嵩高い置換基を用いてテトラメリゼーション反応において、同様

の嵩高い置換基を有するサブユニットが立体障害のために隣接し得ないようにすることによって行い得る。嵩高いフェニル置換基がジカルボニトリル前駆体において、該前駆体のテトラメリゼーションにおいてサブユニットが対向するようにするために用いられることは、インオーガニック・ケミストリー(1994)、33、1735~1740、ケミストリー・レターズ(1992)、2031~2034およびケミストリー・レターズ(1992)、1567~1570に記載されている。これらの文献はしかしながら、本発明に開示されている新規フタロシアニン誘導体をジイミノイソインドリン前駆体から軸性配位子と共にまたは該リガンドなしで合成する方法は提供していない。

好ましいハイブリッドフタロシアニン誘導体は、2種類の別個のサブユニットを有し、同一サブユニットが対向している構造を有する。特に好ましいハイブリッドフタロシアニン誘導体は、対向同一サブユニットを一つの軸に有し、別個の対向サブユニットを他の軸に有する化合物である。特に好ましい分子は、赤又は青にシフトした励起または放射波長、およびより長いストークスシフトを有するという性質を、テトラメリゼーション反応に用いる前駆体分子の選択の結果として得る。特に好ましいハイブリッドフタロシアニン誘導体は、例えば「ドナー」ジフェニルジイミノイソインドリン前駆体またはジイミノイソインドリン前駆体は、ハイブリッド分子の650nmの吸収に寄与し、これによってハイブリッド

分子が励起される。ジフェニルフェニルジイミノイソインドリン前駆体またはフェニルジイミノイソインドリンは、ジアルキルまたはアリールオキシフェニルジイミノイソインドリン前駆体である「アクセプターサブユニット」への「電子伝達サブユニット」として働き、これによってアクセプターサブユニットによる最低エネルギーにおける放射が、約850 nmにて測定できる。「電子伝達サブユニット」の性質は、このサブユニットが放射すれば、アクセプターサブユニットの所望の放射が得られなくなるため、かかる放射が望ましくないということから、重要である。従って、電子伝達サブユニットのHOMOおよびLUMO性はドナーとアクセプターサブユニット分子に基づいてデザインされるべきである。HOMOおよびLUMOエネルギーの関係は、励起と放射に関係することが、パリザー

らの、ジャーナル・オブ・ケミカル・フィジックス(J. Chem. Phys.) (1953)、21、767~776、ポーブルの、トランス・ファラデー・ソク(Trans. Faraday Soc.) (1953)、49、1375~1385、マックヒューら、セオレティカ・キミカ・アクタ(ベルリン)(1972)、24、346~370およびコバヤシら、インオーガニック・ケミストリー(1994)、33、1735~1740、ケミストリー・レターズ(1992)、2031~2041、コナミら、モレキュラー・フィジックス(1993)、80、153~160に開示されている。

他の適用においては、ハイブリッド分子は一方がおおよそ650 nmで他方がおおよそ680 nmの2つの励起波長を有することが要求されるが、このとき両方の波長に対する放射は約760 nmである。すなわち、励起に関係する前駆体を650 nmのジイミノイソインドリンおよび680 nmテトラフルオロジイミノイソインドリンとすればよい。テトラメリゼーション反応を制御して放射サブユニットが分子内で対向するようにするために用い得る放射サブユニットとしては、ジフェニルフェニルジイミノイソインドリンが挙げられる。得られるハイブリッドフタロシアニン誘導体の励起および放射波長は従って、個々のジイミノイソインドリンを代表する波長である。

その他の適用では、約650 nmの励起波長と約750 nmの放射波長が要求される。励起および放射に寄与する前駆体はそれぞれ、ジイミノイソインドリンおよびジフェニルフェニルジイミノイソインドリンである。後者の前駆体は放射サブユニットが対向するように制御するのにも用い得る。

他の適用においては、励起波長における大きな吸光係数が、約650 nmにおける励起のために必要とされる。放射波長は約850 nm付近であるべきである。励起に関与する前駆体はジフェニルジイミノイソインドリンとすればよく、この前駆体はこれらのサブユニットが対向するように制御し、このために二つのサブユニットは所望の吸光係数を与えるのに寄与する。フェニルジイミノイソインドリン誘導体前駆体は電子伝達サブユニットとして働くことができ、アルコキシフェニルジイミノイソインドリン前駆体は特性放射を850 nm付近に有するアタセ

プターとして働くことができる。

他の適用においては、単一波長で励起した際に、一つの化合物が2つの放射波長を有することが所望される。所望される励起は650 nm付近であり、放射は760 nm付近および810 nm付近である。励起に寄与する前駆体は、テトラフルオロジイミノイソインドリンまたはテトラフルオロベンゼン-1, 2-ジカルボニトリルとすればよい。放射に寄与する前駆体はそれぞれ、ジプトキシフェニルジイミノイソインドリンまたは3, 4-ジプトキシナフタレン-1, 2-ジカルボニトリルとすればよい。

得られる化合物を、その後粒子内へ取り込ませて約600 nm以上の波長で励起を示し、約650 nmで放射を示す粒子を得る。当業者は水溶性ハイブリッドフタロシアニン誘導体はタンパク質、ポリペプチド、ヌクレオチド、核酸およびこれらの類似物を結合させて、これらの物質の生物流体中における存在の検出、またはDNAプローブもしくはイムノアッセイを行うのにも用い得ることを認識するであろう。

好ましい粒径は約0.1 nmから5000 nmであり、好ましくは約1 nmから1000 nmである。粒径の選択は標識の特定の機能に基づいて行うべきであ

る。粒径は、適用の種類に応じて変化させてよい。例えば、イムノアッセイにおいて、非常に低い濃度のアナライトを測定するために標識がより強い蛍光を必要とする場合には、より大きな粒子を選択すればよい。というのはより大きな粒子はより多くの色素分子を取り込むことができるからである。小さな粒径(0.1~1 nm)の粒子を、米国特許第4,420,568、第4,476,229号および第4,510,251号に記載されたごとく蛍光偏向アッセイに用いてもよく、細胞成分のインビトロにおける可視化またはインビボ結像技術に用いてもよい。

適当な励起および放射性質を示す得られた蛍光色素粒子にさらに、特定の目的に必要とされるさまざまな核酸、ヌクレオチド、タンパク質またはペプチドおよびこれらの類似物へ吸収または化学的に反応させる。マクロ分子を粒子内へ吸収するには、特にラテックス粒子内へ吸収するには当業者にはよく知られており、

一般的である巨大分子の5℃から50℃の温度で、分子のpIより低いpHにおいて吸収させる方法を含む方法を用いればよい。例えば、蛍光エネルギー伝達を示す蛍光粒子は、アッセイの反応混合物内の、非競争的イムノアッセイに用いるための抗体または競争的イムノアッセイに用いるためのリガンドアナログのいずれかに含有されていてもよい。非競争的アッセイの場合、反応混合物には少なくとも1つの標的リガンドおよび、少なくとも1つの該標的リガンドに特異的なレセプターが結合している少なくとも1種類の蛍光粒子を含んで抗体(蛍光)共役物を形成しているものを含む。競争的アッセイの場合、反応混合物は少なくとも1の標的リガンド、少なくとも1の該標的リガンドに特異的なレセプターおよび少なくとも1つのリガンドアナログが結合してリガンドアナログ(蛍光)共役物を形成している少なくとも1種類の蛍光粒子を含む。非競争的反応混合物内において標的リガンド結合した抗体共役物、および競争的反応混合物内で標的リガンドに対する特異的レセプターで結合されていないリガンドアナログ共役物は、標的リガンド-抗体共役複合体の標的リガンドの他のエピトープに特異的なレセプター及び、リガンドアナログ共役物のリガンドアナログに特異的なレセプターからなる固相へそれぞれ結合させることができる。固相で結合されていない蛍光共



役物を除き、結合された蛍光を測定する。測定された蛍光は標的リガンド濃度に比例する。上述のさまざまな試薬をラテックス粒子に共有結合させることが可能である。例えば、抗体またはリガンドアナログをそのアミンまたはカルボン酸を、粒子の表面上のカルボン酸またはアミンと結合させて安定なアミド結合を形成してもよい。

試料中の核酸の定量をする場合にも、本発明に開示した新規化合物はその明るさのため、およびその近赤外放射性のために有用である。一般に、核酸のアッセイを行う際には定量しようとする核酸に対して相補的なプローブを選択する。このプローブ分子を、信号発生基と、一般には共有結合によって結合させる。信号発生基は水溶性フタロシアニン誘導体もしくはハイブリッドフタロシアニン誘導体、または蛍光エネルギー伝達を示すかもしくはハイブリッドフタロシアニン誘導体である、またはこれらの化合物の組み合わせである適当な色素系の粒子とす

ればよい。標識されたプローブ分子をその後、標的核酸を含有すると考えられる生物試料へ導入し、標識されたプローブ配列を標的核酸と結合させる。標識されたプローブ／標的核酸をその後、標的核酸に相補的である他の核酸が固定化された表面上に固定化する。反対に、生物試料を固定化した相補的核酸を有する表面へ導入して標的核酸を固定化してもよい。標識したプローブをその後固定化した標的分子へ結合するために、この系へ導入する。過剰の標識されたプローブをその後洗い流し、得られる蛍光強度を標準曲線に対応させて試料中の核酸濃度を測定すればよい。

当業者はイムノアッセイおよび核酸アッセイの多くのバリエーションを行うことができること、および本発明の教示する新規色素系を現在の技術に新規に適用し得ることが認識するであろう。

当業者は、本明細書に記載した新規蛍光粒子がイムノアッセイ、蛍光顕微鏡、インビボ結像、インビトロガン治療、核酸アッセイ、細胞ソーターおよびこれら類似の技術に應用できることを認識するであろう。

#### 実験セクション

約780nmまで放射する色素用パーキンエルマー(Perkin-Elmer)型LS50BLミネサンス分光光度計で蛍光測定を行った。場合によっては、800nm以上放射する色素を実施例18に従って測定した。蛍光度を補正しなかった。吸光測定を、ヒューレット・パカード(Hewlett Packard)8452A二極管配列(Diode Array)分光光度計で行った。

#### 実施例1

##### シリコンフタロシアニンジヒドロキシド $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ の製造

ピリジン(50mL)および水(50mL)中のシリコンフタロシアニンジクロリドの懸濁物(1.83g、3.0ミリモル)を120℃で18時間油浴で攪拌しながら還流した。冷却後、濃い青色の固体状の生成物を濾過し、残渣を水(10mL)、アセトン(5mL)で洗浄し、ついで真空下で乾燥し、標題化合物1.71gを得た。

#### 実施例2

##### シリコンフタロシアニンビス(トリヘキシルシリルオキシド)(以下でしばしば $\text{PcSi}$ トリヘキシルと称する)の製造

クロロトリヘキシルシラン(733 $\mu\text{L}$ 、2.0ミリモル)を含む無水ピリジン(11mL)中のシリコンフタロシアニンジヒドロキシド(115mg、0.2ミリモル)の懸濁物を130℃で5時間油浴で還流した。生成した紫色の溶液を放置して冷却し、蒸発させた。生成したスラリーを氷冷したヘキサン(2mL)で処理し、濃い青色の固体状生成物を濾過し、氷冷したヘキサン(2mL)で洗浄し、真空下で乾燥し、粗製生成物249mgを得た。クロロホルム中の粗製生成物をヘキサン中で平衡化したアルミナカラム(活性1)で精製し、生成物を鮮明な青色のバンドとしてヘキサン/トルエン(2/1、容量/容量)で溶出した。生成物を含む溶媒を蒸発させ、融点171℃(lit融点175℃)を有する標題化合物69mgを得た。

#### 実施例3

##### シリコンフタロシアニンビス[(10-カルボメトキシデシル)ジメチルシリルオキシド](以下でしばしば $\text{PcSi}$ メチルエステルと称する)

無水ピリジン (11 mL) 中のシリコンフタロシアニンジヒドロキシド (115 mg、0.2ミリモル) の懸濁物に、(10-カルボメトキシデシル)ジメチルクロロシラン (586 mg、2ミリモル) を加え、その混合物を130℃5時間油浴で攪拌しながら還流した。濃い青色の溶液を放置して冷却し、溶媒を蒸発させた。ヘキサン中で平衡化したシリカゲル60 Åカラム上で残渣を精製し、生成物をトルエンで青色のバンドとしてゆっくりと溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、ヘキサン (10 mL) を残渣に加え、青色の生成物を濾過し、ヘキサンで洗浄し、乾燥し、標題化合物 105 mg を得た。

#### 実施例 4

シリコンフタロシアニンビス (ジメチルビニルシリルオキシド) (以下でしばしば P c S i ビニル と称する) の製造

無水ピリジン (11 mL) 中のシリコンフタロシアニンジヒドロキシド (115 mg、0.2ミリモル) の懸濁物に、クロロジメチルビニルシラン (276  $\mu$ L、2.0ミリモル) を加え、混合物を130℃5時間油浴で攪拌しながら還流した。暗色の溶液を放置して冷却し、蒸発させた。ヘキサンで平衡化したシリカゲル60 Åカラムで残渣を精製し、生成物を青色バンドとしてトルエンで溶出した。生成物を含む溶出物を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理し、暗青色の固体状生成物を濾過し、ヘキサンで洗浄し、真空下で乾燥し、標題化合物 7.5 mg を得た。

#### 実施例 5

シリコンフタロシアニンビス [(3-シアノプロピル)ジメチルシリルオキシド] (以下でしばしば P c S i シアノ と称する) の製造

無水ピリジン (11 mL) 中のシリコンフタロシアニンジヒドロキシド (115 mg、0.2ミリモル) の懸濁液に、クロロ(3-シアノプロピル)-ジメチルシラン (328  $\mu$ L、2.0ミリモル) を加え、混合物を130℃で5時間油浴で攪拌しながら還流した。紫色の溶液を冷却し、蒸発させた。ヘキサンで平衡化したシリカゲル60 Åカラムで残渣を精製した。カラムをトルエンで洗浄し、生成物をトルエン/イソプロピルアルコール (90/10、容量/容量) で鮮明

な青色のバンドとして溶出した。生成物を含む溶出物を真空下で蒸発させ、260℃以上の融点を有する標題化合物101mgを得た。

#### 実施例6

シリコンフタロシアニンビス(ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド)(以下でしばしばPcSiペンタフルオロと称する)の製造

無水ピリジン(11mL)中のシリコンフタロシアニンジヒドロキシド(115mg、0.2ミリモル)の懸濁液に、クロロジメチルペンタフルオロフェニルシラン(376μL、2.0ミリモル)を加え、混合物を130℃で5時間油浴で攪拌しながら還流した。暗緑色の溶液を放置して冷却し、蒸発させた。ヘキサンで平衡化したシリカゲル60Åカラムで残渣を精製した。生成物を暗青色のバンドとして溶出した。生成物を含む溶出物を真空下で蒸発させ、残渣をヘキサン(10mL)で処理し、暗青色の固体状生成物を濾過し、ヘキサンで洗浄し、真空下で乾燥し、標題化合物73mgを得た。

#### 実施例7

シリコン2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシド(以下でしばしば水酸化NaPcSiと称する)の製造

ピリジン(10mL)および水(10mL)中のシリコン2,3-ナフタロシアニンジクロリド(280mg、0.34ミリモル)の懸濁液を130℃で24時間油浴で攪拌しながら還流した。室温に冷却後に、暗緑色の固体状生成物を濾過し、残渣を洗浄し、逐次、水(5mL)およびアセトン(2mL)で洗浄した。生成物を真空下で乾燥し、標題化合物217mgを得た。

#### 実施例8

シリコン2,3-ナフタロシアニンビス(ジメチルビニルシリルオキシド)(以下でしばしばNaPcSiビニルと称する)の製造

無水ジメチルホルムアミド(1mL)中のシリコン2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシド(87mg、0.11ミリモル)の懸濁液にクロロジメチルビニルシラン(0.042mL、0.3ミリモル)、ついでイミダゾール(14mg、0.2ミリモル)を加えた。混合物を24時間室温でアルゴン下で攪拌した。

溶媒を蒸発させ、ヘキサンで平衡化したシリカゲル60 Åカラムで残渣を精製した。生成物を緑色のバンドとしてトルエンで溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理した。暗緑色の固体を濾過し、ヘキサンで洗浄し、真空下で乾燥し、標題化合物26 mgを得た。

#### 実施例 9

シリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド)(以下でしばしばNaPcSiペンタフルオロと称する)の製造

無水ピリジン(5 mL)中の2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシド(87 mg、0.11ミリモル)の懸濁液にクロロジメチルペンタフルオロフェニルシラン(0.188 mL、1ミリモル)を加えた。混合物を5時間130℃で油浴で攪拌しながら還流した。冷却後に、溶媒を蒸発させ、ヘキサンで平衡化したシリカゲル60 Åカラムで残渣を精製した。生成物を緑色のバンドとしてトルエンで溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理した。暗緑色の固体を濾過し、ヘキサンで洗浄し、真空下で乾燥し、標題化合物23 mgを得た。

#### 実施例 10

種々のサイズであり、色素を配合されたラテックス粒子の一般製造法

種々の色素を以下に概要を示した一般法により種々のサイズとしたラテックス粒子へ配合した。2種の方法を記載し、色素溶液の添加前にテトラヒドロフランまたはジメチルホルムアミドのいずれかの水溶液でラテックス粒子を膨張させることを含む。使用されたラテックス粒子サイズは67 nm~783 nmの範囲であり、当技術の熟練者はより小さいおよびより大きい粒子を使用できることを認識している。粒子を膨張するために使用される有機溶媒の選択は、いずれかの溶

媒中で種々の色素の溶解性に主に依存する。下記の実施例15の表1および表2は、選択された数の色素の各々の色素対またはハイブリッドフタロシアニン誘導体を粒子へ配合するための水性有機溶媒および最適色素濃度を示している。当業者は、程度の異なる蛍光強度を消失を示す粒子を製造するため、より多いまたはより少ない量の色素を粒子へ配合することまたは各色素対の他に対する比を変え

ることによってこれらの方法を様々に変化させ得ることを認識するであろう。当業者は同様の技術は、例えば、米国特許第4,199,363号および同第4,368,258号に記載のようにラテックス粒子への導入に有用であることも認識している。

サイズが67nm～783nmの範囲である界面活性剤不含有ポリスチレンスルフェートラテックス粒子および200nm～400nm粒子の範囲であるカルボキシル修飾ラテックス（「CML」）粒子をインターフェイシャル・ダイナミックス社（ポートランド、オレゴン州）から市販のものを使用した。

#### テトラヒドロフランを使用する方法1

テトラヒドロフラン（0.36mL）を固形分2.5%のラテックス粒子の溶液1.6mLに攪拌しながら室温で5分間かけて滴下して加えた。ラテックス懸濁物を更に30分間室温で攪拌し、ラテックスを膨張した。テトラヒドロフラン中適当な濃度で1種またはそれ以上の色素からなる色素溶液（0.04mL）を攪拌したラテックス溶液に5分間かけて滴下して加え、表1に示されるような配合する色素の濃度（2mL容量中）を得た。ラテックス-色素溶液を暗室で室温で30分間攪拌した。ついで、ラテックス溶液を透析管（スペクトラポール（Spectrapor）、分子量12-14,000カットオフ、スペクトラム社（ヒューストン、テキサス州）製）に移し、色素-ラテックス溶液を4℃で12～15時間水に対して透析した。色素-ラテックス溶液を透析から取り出し、溶液中の固形分のパーセントを透析後の最終容量および開始時の固形分濃度から算出した。

#### ジメチルホルムアミドを使用する方法2

ジメチルホルムアミド（1.33mL）を、固形分6.7%のラテックス粒子の溶液0.6mLに攪拌しながら室温で5分間かけて滴下して加えた。ラテックスの懸濁物を更に30分間室温で攪拌し、ラテックスを膨張した。ジメチルホルムアミド中適当な濃度で1種またはそれ以上の色素からなる色素溶液（0.07mL）を、ラテックス溶液を攪拌しながらそこに5分間かけて滴下して加え、表1に示されるように配合色素濃度（容積2mL中）を得た。ラテックス-色素溶

液を暗下にて室温で30分間かけて攪拌した。ついで、ラテックス溶液を透析管（スペクトラボール、12-14, 000分子量切断、スペクトラム社（ヒューストン、テキサス州）製）に移し、色素-ラテックス溶液を4℃で12～15時間水に対して透析した。色素-ラテックス溶液を透析から取り出し、溶液中の固形分のパーセントを透析後の最終容量および開始時の固形分濃度から算出した。

#### 実施例 11

#### 蛍光強度における色素配合濃度の変更の効果およびラテックス粒子の蛍光強度の最適化

ラテックス粒子への色素の混合は、最大蛍光強度を得るためにおよび色素分子の蛍光消光率を最小にするために最適化しなければならない。粒子中の色素分子が非常に近接しているために、蛍光の消光は顕著であり得る。PcSiビニルを、以下の表に示される種々の濃度で方法1（実施例10）を使用して67nmラテックス粒子（インターフェイシャル・ダイナミックス社製（IDC）、（ポートランド、オレゴン州）から市販の硫酸ポリスチレン）へ加えた。色素ラテックス粒子を水またはテトラヒドロフランのいずれか中に各々色素濃度で固形分を0.0019%に希釈した。溶液を350nmで励起し、680nmでの放射を測定した。粒子中で消光するパーセントは $(1 - [\text{水中の蛍光強度} \div \text{有機溶媒中の強度}]) \times 100$ である。以下の表は、各々条件での色素配合濃度および消光の関数として蛍光強度を示す。

色素配合濃度 (mg/mL)	強度 (680nm)	消光 (%)
0.01	420	41
0.025	489	65
0.05	492	73
0.075	401	76
0.1	338	83
0.15	197	87
0.3	91	90
0.9	34	96

これらの結果は最適配合色素濃度より最高の蛍光強度および最低の消光が得ら

れることを示している。この場合では、配合溶液中の色素濃度0.025~0.05 mg/mLにより最良の強度および最少の消光が得られる。色素間の間隔が著しく増加するために、色素が0.025 mg/mL以下であれば、強度および消光がいっそう少なくなり、粒子中で色素がより密着するために色素が0.05 mg/mL以上であれば、強度がより少なくなり、消光が増大する。この種の実験は蛍光強度を最適にし、消光を最小にする方法を示している。

#### 実施例 1 2

##### ラテックス粒子中の蛍光エネルギー伝達の証明

エネルギー伝達用の種々の色素が取り込まれているラテックス粒子を、水、およびテトラヒドロフランまたはジメチルホルムアミドのいずれか中で固形分0.06%~0.001%に希釈し、および固形分の濃度が等しい溶液を、ドナー色素のほぼ励起最大値に相当する波長で励起した。ラテックスから色素を遊離するために、粒子を有機溶媒に希釈し、これによって、粒子中の色素間のいずれのエネルギー伝達工程も崩壊した。アクセプター色素の放射最大において水および有機溶媒中の溶液の蛍光を記録し、比較した。アクセプターの発光強度が有機溶媒中より水中ですくなくとも5倍高いとき、蛍光エネルギー伝達が有意であると定義した。

#### 実施例 1 3

##### 粒子の蛍光強度におけるラテックス粒子中のアクセプター色素濃度に対するドナ

##### ー色素濃度の変更の効果

メソーテトラ-2-ジメチルアミノフェニルボルフィリンを以下のように製造した。テトラヒドロフラン(2.5 mL)中のメソーテトラ-2-アミノフェニルボルフィリン(100 mg、0.15ミリモル)および37%ホルムアミド(500  $\mu$ L、6.0ミリモル)の水溶液を攪拌しながら、水素化ホウ素シアノナトリウム(114 mg、1.8ミリモル)を加えた。ついで、混合物を10分間かけて氷酢酸(60  $\mu$ L)で処理し、室温で3時間攪拌した。更に氷酢酸(60  $\mu$ L)を加え、混合物を更に1時間室温で攪拌した。混合物を蒸発させ、残渣をトルエンで平衡化したシリカゲル60 Åカラムで精製した。生成物を暗茶色のバ



ンドとしてトルエン／1%イソプロパノールで溶出した。生成物を含む画分を蒸発させ、インクブルー色の固体状残渣を真空下で乾燥し、標題化合物85mgを得た。

メソーテトラ-2-ジメチルアミノフェニルポルフィリン（ポルフィリン社（ローガン、ユタ州）から市販のメソーテトラ-2-アミノフェニルポルフィリンから製造したTdap）およびPcSiビニル（実施例4）を、実施例10のテトラヒドロフラン方法1を使用して67nmラテックス粒子（インターフェイシャル・ダイナミックス社（ポートランド、オレゴン州）製の硫酸ポリスチレンラテックス）へ取り込ませた。Tdap対PcSiビニルのモル比をラテックス配合溶液中1/1～2/1～6/1へと変更し、一方、各々の溶液中でPcSiビニル質量（0.1mg/mL）を一定に維持した。透析した粒子を水中で固形分0.0019%に希釈し、PcSiビニルの680nmにおける蛍光強度を350nm～470nmの励起波長の関数として測定した。Tdapの最大励起波長は430nmであり、PcSiビニルの最大励起波長は350nmである。Tdapの最大放射波長は650nmである。以下の表は結果を示す。

Tdap/PcSiビニル	励起λ (nm)	680nmでの蛍光強度
1/1	350	490
1/1	430	83

1/1	450	38
1/1	470	11
2/1	350	580
2/1	430	830
2/1	450	460
2/1	470	220
6/1	350	600
6/1	430	1800
6/1	450	800
6/1	470	200

ラテックス粒子中のドナー対アクセプターのモル比が1/1から6/1に増加すれば、エネルギー伝達がアクセプター色素の蛍光強度により測定されるように、著しく効率的になるということをこれらの結果は示している。650nmの最大放射波長で粒子中のTdap色素の放射が観察できなかったことは、エネルギー伝達が効率的であるということを示唆する。データはエネルギー伝達経路から得られるラテックス粒子の蛍光強度は、ドナー色素の「光採集(light gathering)」許容性により影響を受けることを示す。従って、ラテックス粒子の蛍光強度の最適化にはドナー対アクセプターのモル比の変更を含む。

#### 実施例14

##### ラテックス粒子の消光および蛍光強度における異なるの色素の混合効果

実施例2～6に記載のように製造された5種のシリコンフタロシアニン類を以下の方法により色素1、3または5種類の色素を一式として67nmの界面活性剤不含有ポリスチレンラテックス粒子(インターフェイシャル・ダイナミックス社(ポートランド、オレゴン州)製)へ取り込ませた。各々シリコンフタロシアニン誘導体は各々350nmおよび680nmに最大励起および放射波長を有した。各々色素-ラテックスの製造後、各々の懸濁物を水またはテトラヒドロフランいずれかに固形分0.057%に希釈した。色素-ラテックス溶液を350n

mで励起し、680nmで蛍光強度を測定した。水中の蛍光強度÷テトラヒドロフラン中の蛍光強度-1はラテックス粒子中の色素の消光度である。

#### ラテックス中の1種のフタロシアニン色素の製造

テトラヒドロフラン(0.1mL)中のPcSiペンタフルオロ色素(0.02mg)の溶液を、ラテックス粒子(1.0mL)の2%固形分溶液を攪拌して、そこに5分かけて滴下して加えた。ラテックス懸濁物を6時間室温で攪拌し、ついで透析管(スペクトラポール(Spectrapor))、分子量12~14,000カットオフ(スペクトラム社(ヒューストン、テキサス州)製)に移し、色素-ラテックス溶液を4℃で12~15時間水に対して透析した。色素-ラテックス溶液を透析から除去し、固体濃度を1.6%に調整した。

#### ラテックス中の3種のフタロシアニン色素の製造

テトラヒドロフラン(0.1mL)中の全色素0.02mgに等モル量のPcSiペンタフルオロ、PcSiトリヘキシルおよびPcSiシアノ色素を含む溶液を、ラテックス粒子(1.0mL)の固形分2%の溶液を攪拌し、そこに5分間かけて滴下して加えた。ラテックス懸濁物を室温で6時間攪拌し、ついで透析管(スペクトラポール、分子量12~14,000カットオフ)(スペクトラム社(ヒューストン、テキサス州)製)に移し、色素-ラテックス溶液を4℃で12~15時間かけて水に対して透析した。色素-ラテックス溶液を透析から除去し、固形分濃度を1.6%に調整した。

#### ラテックス中の5種のフタロシアニン色素の製造

テトラヒドロフラン(0.1mL)中に等モル量のPcSiペンタフルオロ、PcSiトリヘキシル、PcSiシアノ、PcSiビニルおよびPcSiメチルエステル色素を合計で0.02mg含む溶液を、ラテックス粒子溶液(1.0mL)の固形分2%の溶液を攪拌して、そこに5分かけて滴下して加えた。ラテックス懸濁物を室温で6時間攪拌し、ついで透析管(スペクトラポール、分子量12~14,000分子量カットオフ(スペクトラム社(ヒューストン、テキサス州)製))に移し、色素-ラテックス溶液を4℃で12~15時間かけて水に対して

透析した。色素ラテックス溶液を透析から取り出し、固形分濃度%を1.6%に調整した。

以下の表は蛍光実験の結果を詳細に説明するものである。

<u>取り込まれた色素</u>	<u>強度</u>	<u>消光%</u>
1	413	72
3	561	56
5	747	49

ドーターはラテックス中へ取り込まれた異種の色素の数が1～3～5と進むにつれ、粒子中の消光が減少するために蛍光強度が増加することを示す。

#### 実施例 15

蛍光エネルギー伝達色素ラテックス(表1)およびハイブリッドフタロシアニン誘導体類を取り込んだ蛍光ラテックス(表2)の製造および分析

種々の蛍光エネルギー伝達ラテックスを種々のドナーおよびアクセプター色素分子で製造した。表1は各々ドナーおよびアクセプター色素の配合濃度、ドナーおよびアクセプター色素のモル比、実施例10に記載の溶媒系配合色素、および特定固形分濃度で各々粒子サイズの励起および放射波長および蛍光強度を示している。いくつかのエネルギー伝達ラテックスは、同一の色素対を異なる直径のラテックスへ取り込ませた。記載したラテックスの蛍光エネルギー伝達効率 $\eta$ は80%より大きい。第56番に示した色素系は蛍光エネルギー伝達化合物(FET化合物)であるので、ドナーおよびアクセプター対はラテックスへ取り込ませる以前に分子中に存在する。

表2は、実施例10に記載のハイブリッドフタロシアニン誘導体を取り込んだラテックス粒子の特徴および特定固形分濃度における蛍光強度を示す。

表1

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプター	溶媒系 (ラックスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
1. トランス-4-[4-(ジブチルアミノ)スチリル]-1-メチルピリジニウムヨード	0.12 mg/mL	シロコンフクロゲンノンビス(ジメチル-Eニルリルオキソド)	0.1 mg/mL	2:1	THF (0.067μm)	340 (0.0019%)	679nm (475nm)
2. トランス-4-[4-(ジブチルアミノ)スチリル]-1-メチルピリジニウムヨード	0.1 mg/mL	シロコン-2,3-ナフトロゲン ビス(ジメチル-Eニルリルオキソド)	0.23 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	347 (0.057%)	789nm (475nm)
3. トランス-4-[4-(ジブチルアミノ)スチリル]-1-メチルピリジニウムヨード	0.1 mg/mL	1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- チトラメチルイソジカチオンヨード	0.144 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	688 (0.057%)	688nm (645nm)
4. メソ-チトラ-2-7-ミナフエニル オキソ	0.18 mg/mL	シロコンフクロゲンノンビス(ジメチル-Eニルリルオキソド)	0.1 mg/mL	2:1	THF (0.202μm)	1000 (0.00095%)	679nm (420nm)
5. メソ-チトラ-2-7-ミナフエニル オキソ	0.1 mg/mL	1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- チトラメチルイソジカチオンヨード	0.098 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	157 (0.0019%)	676nm (645nm)
6. メソ-チトラ-2-7-ジメチルアミノ フェニル	0.21 mg/mL	シロコンフクロゲンノンビス(ジメチル-Eニルリルオキソド)	0.1 mg/mL	2:1	THF (0.412μm)	209 (0.00095%)	679nm (430nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナーセル: アクセプターセル	溶媒系 (ラックスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
7. 3-エチル-3'-エチルカルボキシ- エチルチアゾロメチンニオン-ダイド	0.056 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニル (ジメチルピニルシリルメチン)	0.25 mg/mL	4:1	DMF (0.067μm)	289 (0.057%)	785nm (650nm)
8. 1,1'-ジエチル-3,3,3'- 3'-トリメチル-インドジカルボキ シアニルカルボレート	0.036 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニル (ジメチルピニルシリルメチン)	0.013 mg/mL	4:1	DMF (0.067μm)	324 (0.057%)	787nm (650nm)
9. 1,1'-ジエチル-3,3,3'- トリメチル(インドジカルボキシアニ ヨ-ダイド	0.078 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニル (ジメチルピニルシリルメチン)	0.025 mg/mL	6:1	DMF (0.067μm)	723 (0.057%)	787nm (635nm)
10. 1,1'-ジエチル-3,3,3'- 3'-トリメチル(インドジカルボキシアニ ヨ-ダイド	0.094 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニル (ジメチルピニルシリルメチン)	0.025 mg/mL	6:1	DMF (0.067μm)	907 (0.057%)	783nm (635nm)
11. 3,3'-ジエチルチアトリカルボ シアニル-ダイド	0.013 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニ ル(ジメチルピニルシリルメチン)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	12 (0.057%)	787nm (650nm)
12. 3,3'-ジエチル チアトリカルボシアニル-ダイド	0.013 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロ ソアゾニル(ジメチルピニルシリルメチン)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	65 (0.057%)	788nm (660nm)
13. 1,9-ジエチルメチル- クロリド	0.008 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロソアゾニル (ジメチルピニルシリルメチン)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067μm)	57 (0.057%)	788nm (650nm)



ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプター	溶媒系 (ラティクスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
20. クロロフィルB	0.244 mg/mL	シリコンポリジメチル ビス(ジメチルジシロキサン)	0.1 mg/mL	2:1	THF (0.067 $\mu$ m)	140 (0.0019%)	679nm (440nm)
21. トランス-4-[4-(ジブチルアミ ノ)フェニル]-1-メチルピリジニウムヨード	0.181 mg/mL	シリコンポリジメチルビス(ジメチル フルオロフェニルシロキサン) + シリコンポリジメチルビス(ジメチル- ビニルシロキサン)	0.07 mg/mL  0.05 mg/mL	4:1:1	THF (0.067 $\mu$ m)	300 (0.0019%)	681nm (475nm)
22. トランス-4-[4-(ジブチルアミ ノ)フェニル]-1-メチルピリジニウムヨード	0.072 mg/mL	シリコンポリジメチル ビス(トリメチルシロキサン) + シリコンポリジメチルビス(ジメチルベン ジフルオロフェニルシロキサン) + シリコンポリジメチル ビス(ジメチルビニルシロキサン)	0.04 mg/mL  0.04 mg/mL  0.03 mg/mL	4:1:1:1	THF (0.067 $\mu$ m)	206 (0.0019%)	681nm (475nm)
23. 3-エチル-3'-カルボキシエチル- ジフルオロベンゾイニウムヨード	0.013 mg/mL	シリコン2,3-ジフルオロエニ ビス(ジメチルビニルシロキサン)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067 $\mu$ m)	76 (0.057%)	788nm (625nm)



ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー-アクセプター比	溶媒系 (ラジカス率%)	強度 (固形分%)	発光放射 (励起)
24. 3-エチル-3'-エチルカルキシン エチルカルキシンジカボシアニソ-グライド	0.013 mg/mL	シロコソ-2, 3-ナフトロジニ- ビス(ジメチルピニルシロキジ)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067%)	135 (0.057%)	788nm (630nm)
25. 3, 3'-ジエチルカルキシン ジカボシアニソ-グライド	0.013 mg/mL	シロコソ-2, 3-ナフトロジニ- ビス(ジメチルピニルシロキジ)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067%)	59 (0.057%)	787nm (660nm)
26. 3, 3'-ジエチルカルキシン ジカボシアニソ-グライド	0.012 mg/mL	シロコソ-2, 3-ナフトロジニ- ビス(ジメチルピニルシロキジ)	0.025 mg/mL	1:1	DMF (0.067%)	57 (0.057%)	787nm (590nm)
27. 1, 1'-ジハキシン-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカボシアニソ グライド	0.094 mg/mL	シロコソ-2, 3-ナフトロジニ- ビス(ジメチルピニルシロキジ) + シロコソナフトロジニビス(ジメチル- エチルピニルシロキジ)	0.025 mg/mL 0.05 mg/mL	6:1:2	DMF (0.431%)	127 (0.057%)	788nm (650nm)
28. 1, 1'-ジハキシン-3, 3, 3', 3'- テトラメチルインドジカボシアニソ グライド	0.094 mg/mL	シロコソ-2, 3-ナフトロジニビス- (ジメチルピニルシロキジ) + シロコソナフトロジニビス(ジメチル- エチルピニルシロキジ)	0.025 mg/mL 0.05 mg/mL	6:1:2	DMF (0.431%)	193 (0.057%)	788nm (635nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	比率: アクセプター:ドナー	溶媒系 (アッセイサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
29. 1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- テトラメチル-インドゾカルボキシアニ オン ヨ-タイプ	0.03 mg/mL	シリコン2,3-ナフトロアジ ン ビス(ジメチルヘキシルピニルシロキ シド)	0.05 mg/mL	1:1	DMF (0.431μmCML)	275 (0.057%)	788nm (650nm)
30. 1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- テトラメチル-インドゾカルボキシアニ オン ヨ-タイプ	0.1 mg/mL	シリコン2,3-ナフトロアジ ン ビス(ジメチルトリフェニルシロキ シド)	0.2 mg/mL	1:1	DMF (0.431μmCML)	163 (0.057%)	798nm (660nm)
31. 1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- テトラメチル-インドゾカルボ キシアニオン ヨ-タイプ	0.09 mg/mL	シリコンナフトロアジ ン ビス(ジメチル ピニル)	0.05 mg/mL	4:1	DMF (0.431μmCML)	153 (0.057%)	790nm (650nm)
32. 1,1',3,3',3'- ヘキサメチルインドトリカルボキ シアニオン ヨ-タイプ	0.216 mg/mL	シリコン2,3-ナフトロアジ ン ビス(ジメチルピニルシロキ シド)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.431μmCML)	0.4 (0.00057%)	788nm (635nm)
33. 1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- テトラメチル-インドゾカルボキシアニ オン ヨ-タイプ	0.512 mg/mL	1,1',3,3',3'- ヘキサメチルインドトリカルボキ シアニ オン ヨ-タイプ	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.431μmCML)	0.9 (0.00057%)	776nm (635nm)
34. 1,1'-ジヘキシル-3,3',3'- テトラメチル-インドゾカルボキシアニ オン ヨ-タイプのリチウム塩を 用いた 錯体	0.16 mg/mL	シリコン2,3-ナフトロアジ ン ビス(ジメチルヘキシルピニルシロ キシド)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216μmCML)	22 (0.00057%)	788nm (635nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	溶媒系 (ラテックスサイズ)	強度 (%固形分)	最大放射 (励起)
35. シリコンアクリロアミンビス(ジメチルアミン)オキシド	0.334 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトロジニ ビス(ジメチルアミン)オキシド	0.1 mg/mL	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	1 (0.00057%)	800nm (650nm)
36. 1,1',3,3',3'- ヘキサメチルインドトリカチオン クロロレート	0.23 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトロジニ ビス(ジメチルアミン)オキシド	0.1 mg/mL	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	0.4 (0.00057%)	780nm (635nm)
37. 1,1',3,3',3'- ヘキサメチルインドトリカチオン クロロレート	0.19 mg/mL	シリコンアクリロアミン-2,3-ナフトロ ジニビス(ジメチルアミン)オキシド	0.1 mg/mL	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	0.7 (0.00057%)	780nm (635nm)
38. オキジニルクロレート	0.01 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトロジニ ビス(ジメチルアミン)オキシド	0.025 mg/mL	DMF (0.067 $\mu$ m)	291 (0.057%)	788nm (650nm)
39. 3,3'-ジプロピル-チアゾル ジニオン-染料	0.232 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトロジニ ビス(ジメチルアミン)オキシド	0.1 mg/mL	DMF (0.431 $\mu$ mCML)	0.4 (0.00057%)	788nm (635nm)
40. 銅テトラ-エチルアクリロアミン	0.72 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトロジニ (ジメチルアミン)オキシド	0.1 mg/mL	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	0.2 (0.00057%)	788nm (650nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプターモル比	溶媒系 (ガラスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
41. (E, E)-3,5-ビス-(4- フェニル-1,3-ブタジエニル)-4,4'- ジメチル-4-ネオ-3a, 4a-ジフェ ニル-インディ	0.16 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	DHF (0.216 $\mu$ mCML)	42 (0.00057%)	785nm (670nm)
42. 7,8-ジメチル-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.28 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	0.5 (0.00057%)	788nm (650nm)
43. 7,8-ジメチル-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.29 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	DHF (0.216 $\mu$ mCML)	0.1 (0.00057%)	788nm (650nm)
44. (E, E)-3,5-ビス-(4- フェニル-1,3-ブタジエニル)-4,4'- ジメチル-4-ネオ-3a, 4a-ジフェ ニル-インディ	0.14 mg/mL	7,8-ジメチル-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	1.8 (0.00057%)	774nm (650nm)
45. 鉄7,8-ジメチル-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.26 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	0.3 (0.00057%)	788nm (670nm)
46. (E, E)-3,5-ビス-(4- フェニル-1,3-ブタジエニル)-4,4'- ジメチル-4-ネオ-3a, 4a-ジフェ ニル-インディ	0.16 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	0.7 (0.00057%)	783nm (670nm)
47. (E, E)-3,5-ビス-(4- フェニル-1,3-ブタジエニル)-4,4'- ジメチル-4-ネオ-3a, 4a-ジフェ ニル-インディ	0.15 mg/mL	シリコン-2,3-ナフトキノ ビス(ジメチルヘキシルエニル)オキシド	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	16.9 (0.00057%)	783nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 (ng/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプター	溶媒系 (ナノグリス)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
48. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.19 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチロ-2-メチルオキシ ド)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	31.5 (0.00057%)	783nm (670nm)
49. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.15 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチロ-2-メチルオキシ ド)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	13.1 (0.00057%)	783nm (670nm)
50. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.15 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチロ-2-メチルオキシ ド)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	4.7 (0.00057%)	783nm (670nm)
51. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.14 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチロ-2-メチルオキシ ド)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	11.7 (0.00057%)	783nm (670nm)
52. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.12 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(トリ-2-メチロ-1, 1, 2, 2- テトラ-ヒドロキリ-1-ジメチ ロ)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	22.3 (0.00057%)	783nm (670nm)
53. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-フタジニル)-4, 4'- ジメチロ-4-キリ-3a, 4a-ジッ S-1777	0.12 ng/mL	シリコン2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチロ-2-メチルオキシ ド)	0.1 ng/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	16.1 (0.00057%)	783nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナーとアクセプターの割合	溶媒系 (ラテックスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
54. 5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.3 mg/mL	5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	1.3 (0.00057%)	783nm (670nm)
55. 5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.3 mg/mL	5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	0.6 (0.00057%)	783nm (670nm)
56. 5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル (マレイニド-7)化合物	0.15 mg/mL	5,5'-ジメチル-2,2'-ビフェニル (マレイニド-7)化合物	0.1 mg/mL		THF (0.067 $\mu$ m)	209 (0.0019%)	681nm (470nm)
57. 3,3'-ジエチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.57 mg/mL	5,5'-ジメチル-1,1'-ジエチル- 7,7'-ジエチル-10,12- エチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.1 mg/mL	4:1	DMEF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.048 nA (0.00057%)	832nm (670nm)
58. 1,1',3,3',3'-ヘキサ メチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.61 mg/mL	5,5'-ジメチル-1,1'-ジエチル- 7,7'-ジエチル-10,12- エチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.1 mg/mL	4:1	DMEF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.149nA (0.00057%)	832nm (670nm)
59. 1,1',3,3',3'-ヘキサ メチル-4,4',5,5'-ジエチル- 2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.51 mg/mL	5,5'-ジメチル-1,1'-ジエチル- 7,7'-ジエチル-10,12- エチル-2,2'-ビフェニル ジエチルエーテル	0.1 mg/mL	4:1	DMEF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.046nA (0.00057%)	832nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプター	溶媒系 (ラテックス)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
60. 1, 1'-ジハキシル-3, 3'- 3'-テトラメチル-インドジカボリン ヨージド	0.23 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-14.12nA (0.00057%)	783nm (670nm)
61. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ナフトジニル)-4, 4- ジメチル-4-キア-3a, 4a-ジテ S-インジキ	0.16 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-5.00nA (0.00057%)	783nm (670nm)
62. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ナフトジニル)-4, 4- ジメチル-4-キア-3a, 4a-ジテ S-インジキ	0.26 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-2.74nA (0.00057%)	858nm (670nm)
63. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ナフトジニル)-4, 4- ジメチル-4-キア-3a, 4a-ジテ S-インジキ	0.32 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-4.07nA (0.00057%)	762nm (670nm)
64. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ナフトジニル)-4, 4- ジメチル-4-キア-3a, 4a-ジテ S-インジキ	0.28 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-1.76nA (0.00057%)	772nm (670nm)
65. 1, 1'-ジハキシル-3, 3'- 3'-テトラメチル-インドジカボリン ヨージド	0.19 mg/mL	シリコン-2, 3-ナフトロジニ ビス(ジメチルハキシルピニルジカボリン)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.712nA (0.00057%)	858nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 (ng/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (ng/mL)	比率: アクセプター:ドナー	溶媒系 (ラテックスサイズ)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
66. 3, 3'-ジエチルチ- トリカルボニル-4- イソプロピル	0.16 mg/mL	シリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフト- ジエニル (ジメチルヘキシルジエニル オキシド)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.058nA (0.00057%)	858nm (670nm)
67. 1, 1', 3, 3', 3'- ヘキサフルオロトリカルボニル ヘキサフルオロ	0.15 mg/mL	シリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフト- ジエニル (ジメチルヘキシルジエニル オキシド)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.141nA (0.00057%)	858nm (670nm)
68. 1, 1', 3, 3', 3'- ヘキサフルオロ-4, 4', 5, 5'-ジヘキシル- 2, 2'-インドールトリカルボニル ヘキサフルオロ	0.19 mg/mL	シリコンオクタエトキシ-2, 3- ナフトジエニル (ジメチルヘキシル- ジエニルオキシド)	0.1 mg/mL	4:1	DMF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.058nA (0.00057%)	858nm (670nm)
69. (E,E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ジエニル)-4, 4'- ジメチル-4-キ-3a, 4a-ジエニル S-イソプロ	0.2 mg/mL	シリコンオクタエトキシ-2, 3- ナフトジエニル (ジメチルヘキシル- ジエニルオキシド)	0.15 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-2.720nA (0.00057%)	858nm (670nm)
70. (E,E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ジエニル)-4, 4'- ジメチル-4-キ-3a, 4a-ジエニル -S-イソプロ	0.16 mg/mL	シリコン2, 3-ナフトジエニル (ジメチルヘキシルジエニルオキシド)+ シリコンオクタエトキシ-2, 3- ナフトジエニル (ジメチルヘキシル- ジエニルオキシド)	0.1 mg/mL 0.12 mg/mL	4:1:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-2.38nA (0.00057%)	858nm (670nm)





ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	ドナー:アクセプターモル	溶媒系 (ラテックス系)	強度 (%固体)	最大放射 (励起)
76. (E,E)-3,5-ビス-(4-フェニル-1,3-ブタジエン)-4,4'-ジカルボ-4-チ-3a, 4a, ジア- S-インケン	0.24 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3- ブタジエンジカルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-1.724nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
77. テトラキス(4-グミルフェ/キシ) ブタジエン	0.36 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3- ブタジエンジカルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.162nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
78. テトラキス(フェニル) ブタジエン	0.26 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3- ブタジエンジカルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.061nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
79. グルマニル-テトラ- ブタジエンジカルボ	0.42 mg/mL	5,5'-ジカルボ-1,1'- ジフェニル-3,3'-ジフェニル- 10,12-エチレンテトラリカルボ カルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.109nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
80. グルマニル-テトラ- ブタジエンジカルボ	0.22 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3- ブタジエンジカルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.045nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
81. グルマニル-テトラ- ブタジエンジカルボ	0.2 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3- ブタジエンジカルボ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 $\mu$ mCML)	-0.042nA (0.00057%)	>900nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 (mg/mL)	アクセプター色素	配合濃度 (mg/mL)	比率: ドナー:アクセプター	溶媒系 (ラテックス%)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
82. 9,10-メチレン-9,10-ジフルオロアントラセン	0.42 mg/mL	5,5'-ジクロロ-1,1'-ジフェニルアミノ-3,3'-ジエチル-10,12-エチレンジトリフルオロシアンベンゼン	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 μmCML)	-0.081nA (0.00057%)	832nm (670nm)
83. 9,10-メチレン-9,10-ジフルオロアントラセン	0.22 mg/mL	スズキカブトキシ-2,3-ナフトロ-ジニソジクロロ	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 μmCML)	-0.052nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
84. 9,10-メチレン-9,10-ジフルオロアントラセン	0.2 mg/mL	スズカカブトキシ-2,3-ナフトロジニソ ビス(トリエチルシリルオキシ)	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216 μmCML)	-0.050nA (0.00057%)	>900nm (670nm)
85. (E,E)-3,5-ビス-(4-フェニル-1,3-ジケチル)-4,4'-ジフルオロ-4,4'-ビス-3a,4a-ジフェニル-5-イソキノリン	0.16 mg/mL	ジリコ-2,3-ナフトロ ジニソビス(ジメチルシリルオキシ) + シリルオキシ 5,5'-ジクロロ-1,1'-ジフェニルアミノ-3,3'-ジエチル-10,12-エチレンジトリフルオロシアンベンゼン	0.1 mg/mL 0.072 mg/mL	4:1:1	THF (0.216 μmCML)	-0.315nA (0.00057%)	858nm (670nm)

ドナー色素	配合濃度 mg/mL	アクセプター色素	配合濃度 mg/mL	ドナー: アクセプター	溶媒系 (ラックス比)	強度 (固形分%)	最大放射 (励起)
86. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ジメチル)-4, 4- ジメチロ-4-ギラ-3a, 4a-ジテ S-インデ	0.24 mg/mL	5, 5'-ジフル-1, 1'-ジフェニ 7ミル-3, 3'-ジエチル-10, 12- エチルチアトリフルボジニルフル	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216mCML)	-2.230nA (0.00057%)	832nm (670nm)
87. 1, 1'-ジヘキシル-3, 3, 3', , 3'-テトラメチルインジフルボジニ ヨ-グ	0.34 mg/mL	5, 5'-ジフル-1, 1'-ジフェニ 7ミル-3, 3'-ジエチル-10, 12- エチルチアトリフルボジニルフル	0.1 mg/mL	4:1	THF (0.216mCML)	-0.545nA (0.00057%)	823nm (670nm)
88. (E, E)-3, 5-ビス-(4- フェニル-1, 3-ジメチル)-4, 4- ジメチロ-4-ギラ-3a, 4a-ジテ S-インデ	0.16 mg/mL	シロコ2, 3-ナフタロジニ ビス(シメチルヘキシル)ニルボジ + シロコ2, 3-ナフタロジニ ビス(シメチルヘキシル)ニルボ ジニルボジ	0.07 mg/mL	4:1:1	THF (0.216mCML)	49 (0.00057%)	783nm (670nm)

表 2

ハイブリッド化合物	配合濃度 (ng/mL)	溶媒系	ラゲージ	%固体	強度	放射 最大	励起
1. シリコン[ジ(1,6-ジ7エニルナフタロジエニル)] ジフタロジエニルビス(ジメチルホキシロニルシリルホキシド)	2.0 ng/mL	THF	0.216 μmCML	0.00057%	50	760nm	650nm
2. シリコン[ジ(1,6-ジ7エニルナフタロジエニル)] テトラフルオロフタロジエニル フタロジエニル ビス(ジメチルホキシロニルシリルホキシド)	2.0 ng/mL	THF	0.216 μmCML	0.00057%	0.7/0.5	765nm/ 825nm	650nm
3. シリコン[ジ(1,6-ジ7エニルナフタロジエニル)] テトラフルオロフタロジエニル フタロジエニル ビス(ジメチルホキシロニルシリルホキシド)	1.5 ng/mL	THF	0.216 μmCML	0.00057%	0.5/0.3	770nm 839nm	650nm
4. シリコン[ジ(1,6-ジ7エニルナフタロジエニル)] ジフタロジエニルビス(ジメチルホキシロニルシリルホキシド)	0.1 ng/mL	THF	0.216 μmCML	0.00057%	0.2	775nm	650nm
5. シリコン[ジ(1,6-ジ7エニルナフタロジエニル)] ジ(テトラフルオロフタロジエニル)ビス(ジメチルホキシロニルシリルホキシド)	1.5 ng/mL	THF	0.216 μmCML	0.00057%	19	758nm	650nm

## 実施例 16

## ラテックス粒子への抗ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)抗体の吸収

実施例 10 の記載と同様に製造された染色されたラテックス粒子に対する抗体、および染色されていないラテックス粒子に対する抗体の補体の吸収の具体例は共に以下に概要を示す、hCG のサンドウィッチアッセイに使用できる。当業者

によって種々の技術はラテックス粒子へのプロテイン、ペプチド、リガンドアナログヌクレオチドおよび核酸の吸収または共有結合に利用され得ることが認識されている。20 mM 硼酸ナトリウム / 150 mM 塩化ナトリウム (pH 8.2) 中の抗- $\beta$ hCGモノクローナル抗体 (0.2 mL、6.6 mg/mL; アプライド・バイオテック社 (サンディエゴ、カリフォルニア州) 製) の溶液にボルテックス (vortex) をかけながら、色素ラテックス (0.1 mL、固形分2%、412 nm; エントリ (entry) 10、表1) の溶液を素早く加えた。室温で抗体ラテックス溶液にボルテックスをかけながら、0.1 M クエン酸カリウム溶液 (pH 3) (0.04 mL) を素早く加え、生成した溶液のpHを3.5にした。溶液を室温で5時間インキュベートし、ついで、2 M 硼酸カリウム溶液 (pH 9.7) (0.025 mL) を素早く加え、ボルテックスをかけて、pHを約8.5にした。このラテックス抗体抱合体を20 mM ホウ酸ナトリウム / 150 mM 塩化ナトリウム (pH 8.2) 各々2 Lを4回交換して4℃で4日間透析 (スペクトラボール透析管、分子量300,000カットオフ (スペクトラム社 (ヒューストン、テキサス州) 製)) した。ついで、透析したラテックス抱合体を透析管から取り出し、固体濃度を0.4%になるように算出した。この抱合体は血清中hCGのイムノアッセイに使用できる。ラテックスは、励起および放射波長各々、650 nmおよび780 nmを有する。

20 mM 硼酸ナトリウム / 150 mM 塩化ナトリウム (pH 8.2) および0.1 M クエン酸カリウム (pH 3) (0.6 mL) 中に抗- $\alpha$ hCGモノクローナル抗体 (0.12 mL、10.3 mg/mL; アプライド・バイオテック社 (サンディエゴ、カリフォルニア州) 製) を含む溶液にボルテックスをかけながら、硫

酸ポリスチレンラテックス溶液 (0.036 mL、固形分8.4%、1000 nm; インターフェイシャル・ダイナミックス社 (ポートランド (オレゴン州) 製)) を室温で素早く加えた。溶液を5時間室温でインキュベートし、エペンドルフ (Eppendorf) 遠心機 (5分間2000×g) 中で遠心分離にかけた。上清を除去し、ペレットを0.1 M リン酸カリウム (pH 7) (1.5 mL) で再懸濁し、懸濁

物を上記のように遠心分離にかけた。この方法を2回繰り返して、最終遠心分離で、固形分を1%にするために、ペレットを0.1Mリン酸カリウム(pH7)(0.3mL)で再懸濁した。この抗体ラテックスを膜のような固相上で使用し、hCGのイムノアッセイにおける反応混合物中の色素抗体ラテックス抱合体複合体を捕獲するのに用いられる。

#### 実施例17

##### hCGのイムノアッセイ

固相抗- $\alpha$ hCGラテックス溶液(0.005mL、固形分1%;実施例16)は、非特異的結合相互作用を低くするために2%コンデンスミルク溶液で処理されている0.45ミクロンナイロン製膜(ミリポア社(ボストン、マサチューセッツ州)製)の2cm<sup>2</sup>片に適用してもよい。この膜をその上でhCG色素ラテックス接合複合体を捕獲する固相として使用できる。すなわち、hCGアッセイは、色素ラテックス抱合体(0.025mL、実施例16)を、hCGを含有していることが予測される1mLの血清試料および既知の濃度のhCG(10、100、300、500および1000mIU/mL)を含有する1mLの血清試料へ添加することによって行うことができる。血清試料を約10分間インキュベートし、ついでその試料を固相膜ラテックスを含む固相膜に適用する。色素ラテックス抱合体を含む血清試料が固相ラテックススポットを通過して流れるよう、膜を吸収剤の上に置くべきである。血清溶液が膜を通した後、色素ラテックス抱合体を含まない血清(0.5mL)を結合されていない色素ラテックス抱合体を除去するために適用する。ついで、膜上のラテックススポットを蛍光計内の前面蛍光付属品内に置き、該スポットを650nmで励起し、各々膜上のスポットの蛍光強度を

780nmで測定する。既知の試料のhCG濃度の関数として蛍光強度をプロットする。グラフから未知のhCG血清の蛍光強度を既知のhCG濃度と比較できる。

#### 実施例18

##### 近赤外線放射色素の測定用の蛍光計

色素試料(10mm×10mm石英製キュベット中2mL試料容量)を低波長透過遮断フィルター(コリオン社製LS700、700nm以下の波長を透過する)を通したダイオードレーザー(サンレーザーSL-6;1=670+/-10nm、0.95mW)により励起した。蛍光放射をダイオードレーザー入射束に対して90°にて検知した。放射された光を集め、2個の非球面レンズ(メレ・グリオ、Cat#01LAG119)からなるコンデンサーによりシリコンホトダイオード(メレ・グリオ、Cat#01LAG119)に焦点を合わせた。シリコンホトダイオードの前の高波長透過遮断フィルター(スコットグラスRG715)は670nmで散乱レーザー光を遮断したが、715nm以上の波長の放射光は透過した。シリコンホトダイオードからの光電流を常用の電流増幅器(メレ・グリオCat#13AMP003)により増幅し、ナノアンペア(「nA」)で表示した。場合によっては、12nm幅のフィルターを730nm、790nm、850nmおよび900nmの中心波長を有するシリコンホトダイオードの前に置いた。

#### 実施例 19

##### シリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(ジフェニルビニルシリルオキシド)の製造

ジフェニルビニルクロロシラン(28μL、0.125ミリモル)およびイミダゾール(7mg、0.1ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(0.5mL)中のシリコン2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシド(39mg、0.05ミリモル)懸濁物をアルゴン下で18時間室温で攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサンで平衡したシリカカラム精製し、長い緑色のバンドとしてトルエン

で生成物を溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、緑色の固体を5mg得た。

#### 実施例 20

##### シリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(トリフェニルシリルオキシド)の製造

トリフェニルクロロシラン(37mg、0.125ミリモル)およびイミダゾール



ール(7 mg、0.1ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中シリコン2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシドの懸濁物を、アルゴン下で室温で18時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサンで平衡化したシリカカラムで精製し、緑色のバンドとしてトルエンで生成物を溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、緑色の固体2.5 mgを得た。

#### 実施例 21

##### シリコン2,3-ナフタロシアニンビス(ジメチルマレイミドエトキシシリルオキシド)の製造

ジクロロジメチルシラン(13.5  $\mu$ L、0.11ミリモル)およびイミダゾール(14 mg、0.2ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中シリコン2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシド(39 mg、0.05ミリモル)の懸濁物をアルゴン下で室温で18時間攪拌した。ついで、反応混合物をN-(2-ヒドロキシエチル)マレイミド(35 mg、0.25ミリモル)で処理し、更に10時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサン、ついで、トルエンで平衡化したカラムで精製し、緑色のバンドとしてトルエン/10%イソプロパノールで生成物を溶出した。生成物を含む溶出物を蒸発させ、緑色の固体3.5 mgを得た。

#### 実施例 22

##### シリコン2,3-ナフタロシアニンビス(ジメチルシリルオキシドトランススチルベン)の製造

ジクロロジメチルシラン(13.5  $\mu$ L、0.11ミリモル)およびイミダゾール(14 mg、0.2ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中シリ

コン2,3-ナフタロシアニンジヒドロキシド(39 mg、0.05ミリモル)の懸濁物をアルゴン下で室温で2時間攪拌した。ついで、反応混合物をトランス-4-ヒドロキシスチルベン(49 mg、0.25ミリモル)で処理し、更に5時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサンで平衡化したシリカカラムで精製し、長い緑色のバンドとしてトルエンで溶出した。生成物を含むトルエ

ン画分を蒸発させ、緑色の固体4 mgを得た。

#### 実施例 23

##### シリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)の製造

7-オクター1-エニルジメチルクロロシラン(32  $\mu$ L、0.125ミリモル)およびイミダゾール(7 mg、0.1ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中のシリコン2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシド(39 mg、0.05ミリモル)の懸濁物をアルゴン下で室温で18時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサンで平衡化したシリカカラムで精製し、生成物を緑色のバンドとしてトルエンで溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理し、暗緑色の固体および薄い緑色の上清を得た。混合物を遠心分離し、上清を除去し、固体をさらにヘキサンで処理し、遠心分離した。上清を再び除去し、固体を真空下で乾燥し、生成物7.3 mgを得た。

#### 実施例 24

##### シリコン2, 3-ナフトロシアニンビス(トリデカフルオロ-1, 1, -2, 2-テトラヒドロオクチル-1-ジメチルシリルオキシド)の製造

(トリデカフルオロ-1, 1, 2, 2-テトラヒドロオクチル)-1-ジメチルクロロシラン(37  $\mu$ L、0.1ミリモル)およびイミダゾール(7 mg、0.1ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中シリコン2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシド(39 mg、0.05ミリモル)の懸濁液をアルゴン下室温で2時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、残渣をヘキサンで平衡化したシリカカラムで精製し、ヘキサン/20%トルエン、ついでヘキサン/40%トル

エンで溶出し、緑色のバンドとして生成物を得た。生成物溶出液を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理し、緑色の固体を得た。混合物を遠心分離し、上清を除去し、固体を更にヘキサンで処理し、再遠心分離した。上清を再びを除去し、緑色の固体を真空下で乾燥し、生成物7.5 mgを得た。

#### 実施例 25

シリコン2, 3-ナフタロシアニンビス(ジメチルレチノール)の製造

ジクロロジメチルシラン(13.5 mL、0.11ミリモル)およびイミダゾール(14 mg、0.2ミリモル)を含むジメチルホルムアミド(1 mL)中シリコン2, 3-ナフタロシアニンジヒドロキシド(39 mg、0.05ミリモル)の懸濁物をアルゴン下で室温で攪拌した。20分後、反応混合物を全トランス-レチノール(72 mg、0.25ミリモル)で処理し、更に1時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、ついで、残渣をヘキサンで平衡化したシリカカラムで精製し、緑色の長いバンドとしてトルエンで生成物を溶出した。生成物を含むトルエン画分を蒸発させ、残渣をヘキサンで処理し、暗緑色固体および薄い緑色の上清を得た。混合物を遠心分離し、ヘキサンを除去し、固体を真空下で乾燥し、最終生成物10 mgを得た。

実施例 26シリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフタロシアニンジクロリドの製造

4, 9-ジエトキシ-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン(0.6 g)を、蒸発したばかりのキノリン(12 mL)にアルゴン下で加えた。10分間攪拌した後、シリコンテトラクロリド(4.0 mL)を加え、反応混合物を190℃で1時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、水(120 mL)をゆっくりと加え、未反応のシリコンテトラクロリドを加水分解した。濃いあい色の沈殿物を浮取し、メタノールおよびアセトンで洗浄した。

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{\text{max}}$  nm): 768, 869.

実施例 27シリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフタロシアニンジヒドロキシドの製造

水(15 mL)を含むピリジン(15 mL)中のシリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフタレンジクロリド(1.96 g)の懸濁物を18時間還流した。懸濁液を冷却し、黒色の沈殿物を浮過し、水(10 mL)で洗浄した。沈殿物を真空下で乾燥し、重量(1.37 g、紫色の粉末)を測定した。

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)): 766, 867.

実施例 28

シリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)の製造

7-オクター1-エニルジメチルクロロシラン(0.6 mL)およびイミダゾール(140 mg)を含むジメチルホルムアミド(20 mL)中のシリコンオクタエトキシ-2, 3-ナフトレンジヒドロキシド(1.0 g)の懸濁物をアルゴン下で室温でアルゴン下で24時間攪拌した。反応混合物を回転蒸発機で蒸発させ、クロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-トルエン(1:1))にかけ、真空乾燥し、重量(46 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)、 $\epsilon$ (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 855, 370000。

赤外スペクトル(KBr): 3074, 2958, 2924, 2854, 1589, 1417, 1373, 1348, 1262, 1238, 1194, 1161, 1111, 1044, 1025, 933, 909, 844, 799, 760 cm<sup>-1</sup>。

<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz、CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.0(m, 2, 5-Nc), 7.9(m, 3, 4-Nc), 5.3(m, -CH<sub>2</sub>), 4.6(m, ビニル, -CH<sub>2</sub>), 3.5(m, ビニルCH) 1.8(m, -CH<sub>3</sub>), 1.3(m,  $\epsilon$ -CH<sub>3</sub>), 0.5(m,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 0.1(m,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), -0.8(m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), -1.7(m,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), -2.3(s, -CH<sub>3</sub>)。

実施例29

シリコンナフトロシアニンビス(ジメチルマレイミドフルオレセイン)の製造

フルオレセインATP(0.5 mg, 1.05マイクロモル)を80%メタノール溶液(52  $\mu$ L)中で0.12 M炭酸カリウムの溶液で処理した。5分後、加水分解溶液を1 N塩酸(10  $\mu$ L)中0.5 Mリン酸カリウム/0.1 Mホウ酸カリウム(pH 7.0)を加えることにより冷却した。冷却した加水分解溶液を蒸発乾固し、ジメチルホルムアミド(100  $\mu$ L)に再溶解し、生成した溶液を1.0 mL血清バイアル中シリコンナフトロシアニンビス(ジメチルマレイミド

シリルオキシド)に加えた。ついで、反応混合物を室温で1時間攪拌した。ついで、粗製生成物を、トルエン/20%ジメチルホルムアミドを使用して2枚の3"×3"シリカ板上でクロマトグラフにかけた。溶出後、平板を真空下で乾燥し、よりよく分離するために再度クロマトグラフにかけた。生成物のバンドをかきとり、ジメチルホルムアミド(5 mL)で処理し、30秒間ボルテックスし、シリカから濾過した。濾液を蒸発させ、緑がかった蛍光色の固体0.55 mgを得た。

### 実施例30

#### スズ(IV)オクタブトキシ-2,3-ナフトロシアニンビス(トリエチルシリルオキシド)の製造

トリエチルシラノール(77  $\mu$ L)、ナトリウム(3.5 mg)およびキシレン(5 mL)の混合物をアルゴン下で1時間還流し、僅かに冷却した。キシレン(5 mL)中のスズ(IV)オクタブトキシ-2,3-ナフトロシアニンジクロリド(74 mg)溶液を生成した溶液に加え、混合物を20分間還流した。生成物を水(1回25 mL)で2回洗浄し、乾燥( $MgSO_4$ )し、回転蒸発機で蒸発させて暗赤色の固体を得た。この固体をクロマトグラフィー(シリカゲル、70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、トルエン-イソプロパノール)にかけ、真空乾燥し、重量(17 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)、 $\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )): 900、174000。

### 実施例31

#### スズ(IV)2,3-ナフトロシアニンビス(トリエチルシリルオキシド)の製造

トリエチルシラノール(77  $\mu$ L)、ナトリウム(3.5 mg)およびキシレン(8 mL)の混合物をアルゴン下で1時間還流し、わずかに冷却した。スズ(IV)2,3-ナフトロシアニンジクロリド(45 mg)を生成した溶液に加え、混合物を5日間還流した。懸濁物を濾過し、固体を洗浄(キシレンおよび水)し、真空乾燥し、重量(41 mg)を測定した。固体をクロマトグラフィー(シ

リカゲル70～230メッシュ、60 Å、2×50 cm、塩化メチレン-テトラヒドロフラン)にかけ、真空乾燥し、重量(26 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)、 $\epsilon$ (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)):  
700、746; 786、253000。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)): 820。

### 実施例32

#### スズ(IV)2,3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)の製造

7-オクター1-エニルジメチルシラノール(186 mg)、ナトリウム(7 mg)、およびキシレン(10 mL)の混合物をアルゴン下で4時間還流し、わずかに冷却した。スズ(IV)2,3-ナフトロシアニンジクロリド(90 mg)を生成した溶液に加え、混合物を4時間還流した。懸濁物を濾過し、固体をキシレン(5 mL)および水(5 mL)で洗浄した。濾液の有機相を分離し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、および回転蒸発機で蒸発させた。残渣をヘキサン(1回2 mL)で2回粉碎し、明緑色の固体を得、真空乾燥し、重量(8.5 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)、 $\epsilon$ (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)):  
670、7200; 732、69900; 786、84900。

### 実施例33

#### スズ(IV)オクタブトキシ-2,3-ナフトロシアニンジクロリドの製造

アルゴン雰囲気下で四塩化スズ(234 μL)を乾燥ジメチルホルムアミド(1

5 mL)中オクタブトキシ-2,3-ナフトロシアニン(310 mg)の混合物に加え、混合物を6時間攪拌しながら還流した。生成物を冷却し、懸濁物を濾過し、暗赤色固体をジメチルホルムアミド(5 mL)および水(5 mL)で洗浄し、真空乾燥し、重量(288 mg)を測定した。

### 実施例34

#### スズ(IV)オクタブトキシ-2,3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシ

ルビニルシリルオキシド)の製造

7-オクター1-エニルジメチルシラノール(186mg)、ナトリウム(7mg)およびキシレン(10mL)の混合物をアルゴン下で5時間還流し、わずかに冷却した。スズ(1V)オクタブチル-2,3-ナフタロシアニンジクロリド(37mg)を生成した溶液に加え、混合物を2日間還流した。生成物を水(10mL)で洗浄し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、回転蒸発機で蒸発させ、暗赤色の固体を得た。この固体をクロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60Å、2×50cm、トルエン-イソプロパノール)にかけ、真空乾燥し、重量(17mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\text{max}}$ (nm)): 785; 893, 227000。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\text{max}}$ (nm)): 789。

実施例357-オクター1-エニルジメチルシラノールの製造

トリエチルアミン(1.5mL)、水(0.18mL)およびエーテル(15mL)の混合物を氷/水浴中で攪拌しながら、そこにエーテル(2mL)中7-オクター1-エニルジメチルクロロシラン(2.56mL)の溶液を1時間滴下して加えた。生成物を氷/水浴中でさらに1時間攪拌し、濾過し、エーテル(10mL)で濾過した固体を洗浄した。濾液を回転蒸発機で蒸発させ、残渣をヘキサン(30mL)と水(30mL)の間に分配した。有機相を分離し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、シリカゲル(70~230メッシュ、60Å)を通して濾過し、へ

キサン(100mL)で洗浄した。濾液を回転蒸発機で蒸発させ、無色の油を得、真空乾燥し、重量(1.06g)を測定した。

実施例36テトラブプロモテトラブトキシ-2,3-ナフタロシアニンの製造

1,4-ジブトキシナフタレン-2,3-ジカルボニトリル(161mg)および2,3-ジブプロモ-6,7-ジシアノナフタレン(168mg)を、アルゴ

ン雰囲気下で1-ブタノール(2 mL)中のリチウム金属(35 mg)の溶液を還流し、そこに加えた。反応溶液を2時間還流で維持し、冷却し、氷酢酸(10 mL)中へ攪拌した。30分後、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、残渣を塩化メチレン(10 mL)中に溶解した。溶液を1 N塩酸(1回10 mL)で2回、水(10 mL)で洗浄し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-トルエン)にかけ、固体状生成物をヘキサン(2 mL)で粉碎し、真空乾燥し、重量(8 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)): 743; 839。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)): 789。

### 実施例 37

#### ジ(1, 6-ジブトキシ-2, 3-ナフトロシアニン)ジ(テトラフルオロフタロシアニン)の製造

1, 4-ジブトキシナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル(161 mg)およびテトラフルオロフタロニトリル(100 mg)を、アルゴン雰囲気下で1-ブタノール(2 mL)中のリチウム金属(35 mg)の溶液を還流して、そこに加えた。反応溶液を1時間還流で維持し、冷却し、氷酢酸(10 mL)へ攪拌した。30分後、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、残渣を塩化メチレン(10 mL)中で溶解した。溶液を1 N塩酸(1回10 mL)で2回、水(10 mL)で洗浄し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣を2回クロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-トルエン)

にかけ、明緑色の画分を真空乾燥し、重量(10 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)、 $\epsilon$ (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)): 679, 25800; 752, 88200; 789; 76500。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{\max}$ (nm)): 815。

### 実施例 38

#### ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)ジ(テトラフルオロフタ



ロシアニン)の製造

1, 4-ジフェニルナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル (165 mg) およびテトラフルオロフタロニトリル (100 mg) を、アルゴン下で1-ブタノール (2 mL) 中のリチウム金属 (35 mg) の溶液を還流し、そこに加えた。反応溶液を1.5時間還流で維持し、冷却し、および氷酢酸 (10 mL) へ攪拌した。30分後、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、残渣を塩化メチレン (10 mL) 中に溶解した。溶液を1 N塩酸 (1回10 mL) で2回、水 (10 mL) で洗浄し、乾燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフ (シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサントルエン) にかけて、明緑色の画分を真空乾燥し、重量 (7 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm),  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 747, 86800。

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)): 760。

実施例39ジブトキシ-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリンの製造

1, 4-ジブトキシナフタレン-2, 3-ジカルボニル (1.61 g)、メタノール (1.14 mL) 中の25%ナトリウムメトキシドおよび乾燥1-ブタノール (10 mL) の混合物を攪拌し、ここへ無水アンモニアを30分間ゆっくりと吹き込んだ。アンモニアを引き続いて入れながら、混合物を30分間還流した。生成物を冷却後、回転蒸発機で真空下で溶媒を除去した。残渣をクロマトグラフ

(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、ヘキサントルエン-イソプロパノール) にかけて、黄色の生成物をエーテル (10 mL) で処理し、濾過により捕集し、エーテル (10 mL) で洗浄し、真空乾燥し、重量 (517 mg) を測定した。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.22 (m, 5, 8-H), 7.65 (m, 6, 7-H), 4.23 (m,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 1.97 (m,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 1.61 (m,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 1.04 (t,  $\text{-CH}_3$ )。

実施例 40ジエトキシ-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリンの製造

1, 4-ジエトキシナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル (1.33 g)、メタノール (1.14 mL) 中 25% ナトリウムメトキシドおよび乾燥エタノール (10 mL) の混合物と攪拌し、ここへ無水アンモニアを 20 分間ゆっくりと吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を 2 時間還流した。生成物を冷却後、溶媒を回転蒸発機で真空下で除去した。残渣を塩化メチレン (10 mL) で処理し、生成物を濾過により捕集し、水 (5 mL)、塩化メチレン (5 mL) で洗浄し、真空乾燥し、重量 (766 mg) を測定した。

実施例 41シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)]ジフタロシアニンジヒドロキシドの製造

四塩化ケイ素 (231  $\mu$ L) をアルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン (5 mL) 中のジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン (470 mg) および 1, 3-ジイミノイソインドリン (97 mg) の混合物に加え、混合物を 200℃ で 40 分間攪拌しながら加熱した。生成物を僅かに冷却し、水 (5 mL) で処理し、5 分間還流した。混合物を冷却し、エーテル (30 mL) で処理し、濾過し、エーテル (10 mL) および水 (10 mL) で固体を洗浄した。濾液 (暗緑色) の有機相を分離し、水 (15 mL) で洗浄し、乾燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣を 3 回クロマトグラフ (シリカゲル 70 ~ 2

30メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-塩化メチレン) にかけて、真空乾燥し、重量 (55.5 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)、 $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )) : 640; 680; 714, 67900; 742。

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)) : 750。

実施例 42シリコン[ジ(1, 6-ジエトキシ-2, 3-ナフトロシアニン)]ジフタロシア

ニンジヒドロキシドの製造

四塩化ケイ素 (137  $\mu$ L) を、アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン (3 mL) 中ジエトキシ-1, 3-ジイミノベンズ [f] イソインドリン (227 mg) および 1, 3-ジイミノイソインドリン (58 mg) の混合物に加え、混合物を 2 時間 200 °C で攪拌しながら加熱した。生成物をわずかに冷却し、水 (3 mL) で処理し、5 分間還流した。混合物を冷却し、エーテル (10 mL) で処理し、暗青色固体状生成物を浮取し、エーテル (10 mL) および水 (10 mL) で洗浄し、真空下で重量 (175 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}$  (nm)) : 600, 632, 666, 700, 724, 788。

実施例 43シリコン [ジ (1, 6-ジエトキシ-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンビス (ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド) の製造

シリコン [ジ (1, 6-ジエトキシ-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンジヒドロキシド (85 mg)、7-オクタ-1-エニルジメチルクロロシラン (256  $\mu$ L)、イミダゾール (68 mg) およびジメチルホルムアミド (2 mL) の混合物を 24 時間室温で攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をクロマトグラフ (シリカゲル 70 ~ 230 メッシュ、60 Å、2 × 50 cm) ヘキサントルエン-イソプロパノール) にかき、真空乾燥し、重量 (32 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}$  (nm)) : 601, 633, 667, 702, 731, 822, 904。

実施例 44シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンビス (ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド) の製造 (図 9)

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンジヒドロキシド (30 mg)、7-オクタ-1-エニルジメチルクロロシラン (115  $\mu$ L)、イミダゾール (30 mg) およびジメチルホルムアミド

(650  $\mu$ L)の混合物を室温で30分間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をクロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-トルエン)にかけ、真空乾燥および重量(38 mg)を測定した。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.31, 8.25 (m, 2, 5-Nc, 10, 13-Nc), 7.94 (m, Ar-Nc), 7.95, 7.74 (3, 4-Nc, 11, 12-Pc), 0.68 (m,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 0.21 (m,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), -0.11 (m,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), -1.22 (m,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), -2.14 (m,  $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), -2.76 (s, - $\text{CH}_3$ )。

紫外-可視(テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm),  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )) : 644; 684; 718, 81100; 748。

蛍光(テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)) : 754。

#### 実施例45

##### テトラフルオロ-1, 3-ジイミドベンズ[f]イソインドリンの製造

テトラフルオロフタロニトリル(2.0 g)、メタノール(2.3 mL)中25%ナトリウムメトキシドおよび乾燥ブタノール(10 mL)の混合物を攪拌し、ここへ無水アンモニアを20分間ゆっくりと吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を1時間還流した。生成物を冷却後、溶媒を回転蒸発機で真空下で除去した。残渣をエーテル(50 mL)で処理し、生成物を濾過により

捕集し、水(10 mL)、エーテル(10 mL)で洗浄し、真空乾燥し、重量(0.45 g)を測定した。

#### 実施例46

##### ジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリンの製造

1, 4-ジフェニルナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル(4.3 g)、メタノール(3.0 mL)中25%ナトリウムメトキシドおよび乾燥1-ブタノール(25 mL)の混合物を攪拌し、ここへ無水アンモニアを30分間ゆっくりと吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を1.5時間還流した

。生成物を冷却後、溶媒を回転蒸発機で真空下で除去した。残渣を塩化メチレン (50 mL) で処理し、生成物を濾過により捕集し、水 (10 mL)、塩化メチレン (10 mL) で洗浄し、真空乾燥し、重量 (3.68 g) を測定した。

#### 実施例 4.7

##### シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] ジ (テトラフルオロフタロシアニン) ジヒドロキシドの製造

四塩化ケイ素 (86  $\mu$ L) を、アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン (1 mL) 中ジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ [f] イソインドリン (174 mg) およびテトラフルオロ-1, 3-ジイミノイソインドリン (54 mg) の混合物に加え、混合物を 200°C 1 時間攪拌しながら加熱した。生成物をわずかに冷却し、水 (1 mL) で処理し、5 分間還流した。混合物を冷却し、エーテル (10 mL) で処理し、濾過し、水 (2 mL) およびエーテル (5 mL) で固体を洗浄した。濾液の有機相を分離し、水 (5 mL) で洗浄し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー (シリカゲル 70~230 メッシュ、60 Å、2×50 cm、塩化メチレン) にかけて、真空乾燥および重量 (18 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm),  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 727, 759, 809, 835。

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)): 685, 760, 840。

#### 実施例 4.8

##### シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] (1, 6-ジエトキシフタロシアニン) フタロシアニンジヒドロキシドの製造

四塩化ケイ素 (172  $\mu$ L) を、アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン (2 mL) 中ジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ [f] イソインドリン (347 mg)、ジエトキシ-1, 3-ジイミノベンズ [f] イソインドリン (71 mg) および 1, 3-ジイミノイソインドリン (36 mg) の混合物に加え、混合物を 200°C 1 時間攪拌しながら加熱した。生成物をわずかに冷却し、水 (2 mL) で処理し、5 分間還流した。混合物を冷却し、エーテル (10 mL) で処理

し、濾過し、水(5 mL)およびエーテル(5 mL)で固体を洗浄した。濾液の有機相を分離し、水(10 mL)で洗浄し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、塩化メチレン)にかけ、真空乾燥および重量(6 mg)を測定した。

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 649, 693, 724, 758, 827。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 750。

#### 実施例 49

シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)](テトラフルオロフタロシアニン)フタロシアニンジヒドロキシドの製造

四塩化ケイ素(172  $\mu$ L)を、アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン(2 mL)中ジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン(347 mg)、テトラフルオロ-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン(54 mg)および1, 3-ジイミノイソインドリン(36 mg)の混合物に加え、混合物を200℃1時間攪拌しながら加熱した。生成物をわずかに冷却し、水(2 mL)で処理し、5分間還流した。混合物を冷却し、エーテル(10 mL)で処理し、濾過し、水(5 mL)およびエーテル(5 mL)で固体を洗浄した。濾液

の有機相を分離し、水(10 mL)で洗浄し、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、塩化メチレン)にかけ、真空乾燥および重量(21 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 646, 689, 720, 753, 790。

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 760。

#### 実施例 50

シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)](テトラフ

ルオロフタロシアニン) フタロシアニンビス (ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド) の製造

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフタロシアニン)] (テトラフルオロフタロシアニン) フタロシアニンジヒドロキシド (10.5 mg)、7-オクト-1-エニルジメチルクロロシラン (38  $\mu$ L)、イミダゾール (10 mg) およびジメチルホルムアミド (200  $\mu$ L) の混合物を室温で30分間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下濃縮した。残渣をクロマトグラフィー (シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサントルエン) にかけて、真空乾燥し、重量 (4 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{max}$  (nm)) : 732, 757, 794, 816。

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{max}$ ) : 763, 830。

実施例51

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフタロシアニン)] (テトラフルオロフタロシアニン) フタロシアニンビス (ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド) の製造

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフタロシアニン)] (テトラフルオロフタロシアニン) フタロシアニンジヒドロキシド (10.5 mg)、クロ

ロジメチルペンタフルオロフェニルシラン (28  $\mu$ L)、イミダゾール (10 mg) およびジメチルホルムアミド (200  $\mu$ L) を室温で30分間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をクロマトグラフィー (シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサントルエン) にかけて、2種生成物画分AおよびBを得、真空乾燥し、重量 (各々2.8 mgおよび5.5 mg) を測定した。

A. 紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{max}$  (nm)) : 650, 726, 762, 796, 824。

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{max}$ ) : 770。

B. 紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}(\text{nm})$ ): 651, 726, 763, 796, 824.

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}$ ): 770.

#### 実施例 5.2

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンビス (ジメチルペンタフルオロフェニルシリルオキシド) の製造

シリコン [ジ (1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)] ジフタロシアニンジヒドロキシド (20 mg)、クロロジメチルペンタフルオロフェニルシラン (58  $\mu\text{L}$ )、イミダゾール (20 mg) およびジメチルホルムアミド (450  $\mu\text{L}$ ) の混合物を室温で1時間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をヘキサン (5 mL) で処理し、緑色の固体状生成物を濾過により補集し、ヘキサン (2 mL) で洗浄し、真空乾燥し、重量 (26 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}(\text{nm})$ ): 648, 691, 724, 759.

蛍光 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}(\text{nm})$ ): 768.

#### 実施例 5.3

ジ (1, 6-ジフェニルナフトロシアニン) ジ (t-ブチルフタロシアニン) の製造

1, 4-ジフェニルナフトレンジカルボニトリル (495 mg)、4-t-ブチルフタロニトリル (92 mg)、およびリチウムブトキシド (4.0 mL) の混合物を油浴で1.5時間還流し、冷却した。冷水酢酸 (20 mL) を生成した懸濁物に加え、真空乾燥した。緑色の残渣をジクロロメタン中に再懸濁し、溶液を3000 rpmで15分間遠心分離した。上清を1 N塩酸 (2×20 mL)、ついで水 (1×10 mL) で洗浄した。有機相を真空下で乾燥した。粗製生成物をクロマトグラフ (シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン-トルエン) にかき、真空乾燥し、重量 (4.2 mg) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\max}(\text{nm})$ ,  $\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ):



668, 43297; 688, 86914; 726, 92715; 758, 64329。

蛍光(テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)): 732。

#### 実施例 54

##### 5-ヒューブチル-1, 3-ジイミノイソリンドリンの製造

無水アンモニアを、4-ヒューブチルフタロニトリル(1.8g)、メタノール(2.3mL)中の25%ナトリウムメトキシド、および乾燥1-ペンタノール(20mL)の攪拌した混合物を内へ、ゆっくりと30分間吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を1.5時間還流した。生成物を冷却した後、溶媒を回転蒸発機により除去した。残渣を塩化メチレン(20mL)で処理し、生成物を濾過により捕集し、塩化メチレン(1回10mL)で2回、エーテル(10mL)で洗浄し、真空乾燥し、重量(0.4g)を測定した。

#### 実施例 55

##### 6, 7-ジブromo-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリンの製造

無水アンモニアを、6, 7-ジブromoナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル(0.5g)、メタノール(0.3mL)中の25%ナトリウムメトキシド、および乾燥1-ペンタノール(10mL)の攪拌した混合物内へ50分間ゆっくりと吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を2.5時間還流した。生成物を冷却した後、オレンジ-黄色の固体を濾過により捕集し、エーテル(20mL)で洗浄し、真空乾燥し、重量(0.6g)を測定した。

#### 実施例 56

##### シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフタロシアニン)ジ-ヒューブチルフタロシアニン]ジヒドロキシドの製造

アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン(1mL)中ジフェニル-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン(172mg)および5-ヒューブチル-1, 3-ジイミノイソインドリン(50mg)の混合物に、四塩化ケイ素(57 $\mu$ L)を加え、混合物を攪拌しながら210℃で1時間加熱した。生成物を僅かに冷却し、水(2mL)で処理し、5分間還流した。混合物を冷却し、エーテル

(10 mL)で処理し、濾過し、エーテル(30 mL)で固体を洗浄した。濾液

の有機相を分離し、水(1回20 mL)で2回洗浄し、エーテルを回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、塩化メチレン)にかけ、真空乾燥し、重量(11 g、緑色の固体)を測定した。

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 656, 670, 694, 730, 758。

蛍光(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 767。

#### 実施例 57

シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)]ジ-*t*-ブチルフタロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)の製造

シリコン[ジ(1, 6-ジフェニル-2, 3-ナフトロシアニン)]ジ-*t*-ブチルフタロシアニン)ジヒドロキシド(320 mg)、7-オクチル-1-エニルジメチルクロロシラン(200 μL)、イミダゾール(136 mg)およびジメチルホルムアミド(6 mL)の混合物を室温で12時間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をクロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキササン)にかけた。青色の画分を捕集し、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、重量(150 mg)を測定した。

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 632, 676, 702, 750。

蛍光(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 716。

#### 実施例 58

シリコンオクタブロモ-2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシドの製造

アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン(2 mL)中6, 7-ジブロモ-1, 3-ジイミノベンズ[f]イソインドリン(433 mg)および5-*t*-ブチル-1, 3-ジイミノイソインドリン(100 mg)の混合物に、アルゴン雰囲気下で四塩化ケイ素(114 μL)を加え、混合物を攪拌しながら210℃で1時間加熱した。生成物を僅かに冷却し、水(2 mL)で処理し、15分間還流

した。混合物を冷却し、エーテル(4 mL)で処理し、濾過し、2回エーテル(1回2 mL)で固体を洗浄した。固体を真空乾燥し、重量(0.57 g、暗緑色固体)を測定した。

#### 実施例 59

##### シリコンオクタブロモ-2, 3-ナフトロシアニンビス(ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド)の製造

シリコン[オクタブロモ-2, 3-ナフトロシアニンジヒドロキシド(500 mg)、7-オクター-1-エニルジメチルクロシラン(256  $\mu$ L)、イミダゾール(68 mg)およびジメチルホルムアミド(5 mL)の混合物を室温で12時間攪拌した。生成物を回転蒸発機で真空下で濃縮した。残渣をクロマトグラフ(シリカゲル70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、ヘキサン)にかけ、青緑色画分を捕集し、真空乾燥し、および重量(300 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 694.

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 706.

#### 実施例 60

##### シリコンオクタエトキシナフトロシアニンジクロリドの製造

アルゴン雰囲気下で新たに蒸留したキノリン(10 mL)中4, 7-ジエトキシ-1, 3-ジイミノイソインドリン(1.0 g)の混合物に、四塩化ケイ素(600  $\mu$ L)を加え、混合物を攪拌しながら200℃で1.5時間加熱した。生成物を冷却し、水(10 mL)および塩化メチレン(10 mL)で処理した。有機相を分離し、回転蒸発機で蒸発させた。黒色残渣をエーテル(5 mL)で処理し、濾過した。濾液を乾燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )し、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、真空乾燥し、重量(300 mg、暗緑色の固体)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 742.

紫外-可視(塩化メチレン)( $\lambda_{max}$ (nm)): 764.

赤外スペクトル(KBr): 3435, 3060, 2983, 2932, 2228,

1727, 1603, 1504, 1317, 1256, 1218, 1068, 8

10 cm<sup>-1</sup>.

#### 実施例 6 1

##### ジエトキシ-1, 3-ジイミノイソインドリンの製造

1, 4-ジエトキシ-2, 3-フタロニトリル (1.0 g)、メタノール (1.2 mL) 中 25% ナトリウムメトキシド、および乾燥 1-ペンタノール (20 mL) の攪拌した混合物内へゆっくりと 45 分間吹き込んだ。引き続いてアンモニアを入れながら、混合物を 3 時間還流した。生成物を冷却後に、溶媒を回転蒸発機にて除去した。残渣を真空下で乾燥し、重量 (1.4 g、緑色の固体) を測定した。

#### 実施例 6 2

##### オクタメトキシ-2, 3-ナフタロシアニンの製造

メタノール (7 mL) 中 25% ナトリウムメトキシドに懸濁した 1, 4-ジメトキシナフタレン-2, 3-ジカルボニトリル (820 mg) を 1.5 時間還流し、冷却し、氷酢酸 (50 mL) へ攪拌した。30 分後に、溶媒を回転蒸発機で蒸発させ、残渣を塩化メチレン (100 mL) 中に溶解した。溶液を 10% 塩酸 (100 mL)、ブライン (100 mL) で洗浄し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー (シリカゲル 70~230 メッシュ、60 Å、2×50 cm、トルエン) にかけて、真空乾燥し、重量 (52 mg、赤茶色の固体) を測定した。

紫外-可視 (テトラヒドロフラン) ( $\lambda_{\text{max}}$  (nm)) : 837.

#### 実施例 6 3

##### ゲルマニウムテトラ-*tert*-ブチルフタロシアニンジクロリドの製造

四塩化ゲルマニウム (1.5 mL) をアルゴン雰囲気下で 1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン (7 mL) 中 5-*tert*-ブチル-1, 3-ジイミノイソインドリン (500 mg) およびトリブチルアミン (3.4 mL) の混合物に加え、混合物を 3.5 時間還流した。生成物を冷却し、水 (20 mL) および塩化メチレン

(20 mL) で処理した。有機相を分離し、水 (10 mL) で洗浄し、乾燥 (M

g SO<sub>4</sub>) し、回転蒸発機で蒸発させた。残渣をクロマトグラフィー(シリカゲル 70~230メッシュ、60 Å、2×50 cm、トルエン:イソプロパノール(9:1))にかけ、緑色の画分を捕集し、真空乾燥し、重量(310 mg)を測定した。

紫外-可視(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$  (nm)): 680.

蛍光(テトラヒドロフラン)( $\lambda_{max}$  (nm)): 718, 750.

#### 実施例 6.4

異なるストークスシフトを有するラテックス中種々の色素系の蛍光強度および励起および放射波長に対するヒト血清の影響

表3に掲げるドナーおよびアクセプター色素対またはハイブリッドフタロシアニン誘導体をテトラヒドロフラン溶媒法を使用して0.2ミクロンのラテックス(IDC社(オランダ、オレゴン州)製のCML)内に取り込ませた。ラテックス粒子を、50 mMリン酸カリウム、10 mMホウ酸カリウム、150 mM塩化ナトリウムおよびウシ血清アルブミン(pH 7) 10 mg/mLを含む緩衝液または生ヒト血清のいずれかへ表に掲げた種々の固形分濃度に希釈した。励起および放射波長および相当するストークスシフトは表に掲げられる。

結果は励起波長がヒト血清に吸収される領域にあるとき、生ヒト血清で測定された蛍光強度に非常に影響を及ぼすということを示している。逆に、励起波長が血清がほとんど吸収しない領域にあるとき、ヒト血清で測定されるラテックスの蛍光強度に影響はない。

表3

色素系	励起	放射	ストークス	蛍光	ラテックス固体
(ドナー/アクセプター)	(nm)	(nm)	シフト	強度	(%)
トランス-4-[4-(ジブチルアミノ)-スチリル]-1-メチル-	475	680	205		

シリジウムヨーグaid/				
シリコフクロシアニソ				
ビス(ジメチルビニル-				
シリルオキシド)				
緩衝液			369.0	0.0019
血清			28.0	0.0019
メソ-テトラ-2-アミノ	420	680	260	
フェニルホルフォリン/				
シリコフクロシアニソ-				
ビス(ジメチルビニル-				
シリルオキシド)				
緩衝液			257.0	0.0010
血清			72.0	0.0010
(E, E)-3, 5-ビス-	670	780	110	
(4-フェニル-1, 3-				
ブタンジエニル)-4, 4-				
ジフルオロ-4-ボラ-3a,				
4a-ジアリ-s-インダキソ/				
シリコ2, 3-ナフクロ-				
シアニソビス(ジメチル-				
ヘキシルビニルシリルオキシド)				
緩衝液			20.6	0.0005
血清			19.5	0.0005
1, 1'-ジヘキシル-3,	650	780	130	
3, 3', 3'-テトラメチル-				
インドジカルボシアニソ				
ヨーゾ/シリコ2, 3-				

ナフトロシアニビス

(ジメチルヘキシルビニル-

シリルオキシド)

緩衝液	28.9	0.0005
-----	------	--------

血清	30.2	0.0005
----	------	--------

ハイブリッド化合物

シリコン[ジ(1,6-ジ- 646 760 114

ナフトロシアニン)]ジフタロ-

シアニビス(ジメチル-

ヘキシルビニルシリル-

オキシド)

緩衝液	49.7	0.0007
-----	------	--------

血清	45.3	0.0007
----	------	--------

・蛍光強度は補正されていない。

実施例 65

シリコン[ジ(1,6-ジフェニルナフトロシアニン)]ジフタロシアニンの消光への軸性配位子の効果

シリコン[ジ(1,6-ジフェニルナフトロシアニン)]ジフタロシアニンジヒドロキシドおよびシリコン[ジ(1,6-ジフェニルナフトロシアニン)]ジフタロシアニビス[ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド]を、THF溶媒系を使用して以下の表に示されるように種々色素濃度で0.2ミクロンCMLラテックス(IDC社製(ポートランド、オレゴン州))へ入れた。蛍光ラテックスを5mMリン酸カリウム、1mMホウ酸カリウム緩衝液(pH7)またはテトラヒドロフラン中のいずれかで0.00057%固形分に希釈した。蛍光強度を646nmで励起により測定した。放射を760nmにセットした。結果を以下の表4に表す。

結果は軸性配位子を有さないジヒドロキシハイブリッド誘導体が0.1mg/

mL配合濃度でさえ高程度の消光を示し、一方ではビスジメチルヘキシルビニル

表 4

ス〔ジメチルヘキシルビニルシリルオキシド〕（ハイブリッドフタロシアニン誘導体）およびシリコン 2, 3-ナフタロシアニンビス〔ジメチルヘキシルビニル



シリルオキシド] (ナフトロシアニン誘導体) を、テトラヒドロフラン溶媒系を使用して以下の表に示すように種々の色素濃度で0.2ミクロンCMLラテックス (IDC社製 (ポートランド、オレゴン州)) へ入れた。蛍光ラテックスを5mMリン酸カリウム、1mMホウ酸カリウム緩衝液 (pH7) またはテトラヒドロフラン中のいずれかで0.00057%固形分に希釈した。蛍光強度を以下の表に示した励起および放射波長で測定した。

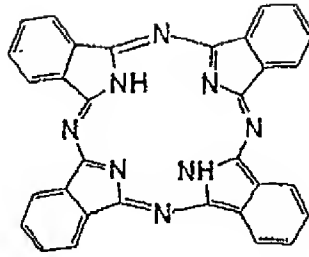
結果はハイブリッドフタロシアニン誘導体がナフトロシアニン誘導体より消光に対する耐性がより強いことを示す。結果はラテックス中において改良された蛍光強度を達成するというハイブリッドフタロシアニン誘導体の特性を示す。

表5

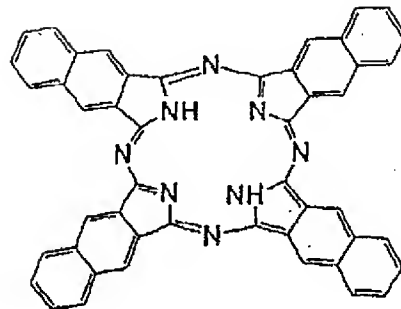
シリル2,3- ナフトロシアニン	ラテックスの 蛍光強度 (励起350nm 放射780nm)	消光 パーセント (励起350nm 放射780nm)	ラテックスの 蛍光強度 (励起650nm 放射780nm)	消光 パーセント (励起650nm 放射780nm)
濃度 (mg/mL)				
0.1	11	0	1	15
0.3	34	13	3	30
0.5	41	19	4	34
0.7	63	26	6	41
0.9	31	32	3	46
1.0	31	28	3	42
2.0	33	36	3	47

シリコン[ジ(1,6- ジフェニルナフクロシアン ビス(ジメチルヘキシル- ビニルシリルオキシド) 濃度(mg/mL)	ラテックスの 蛍光強度 (励起350nm 放射760nm)	消光 パーセント (励起350nm 放射760nm)	ラテックスの 蛍光強度 (励起650nm 放射760nm)	消光 パーセント (励起650nm 放射760nm)
0.1	11	0	6	0
0.3	31	0	16	0
0.5	56	0	28	0
0.7	60	0	30	0
0.9	78	0	39	0
1.0	82	0	41	0
2.0	113	0	58	13

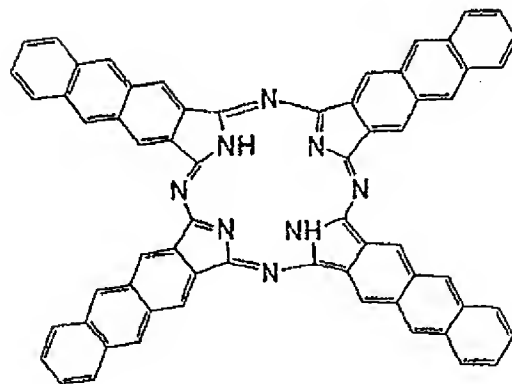
【図1】



フタロシアニン



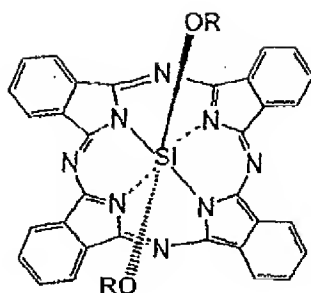
ナフトロシアニン



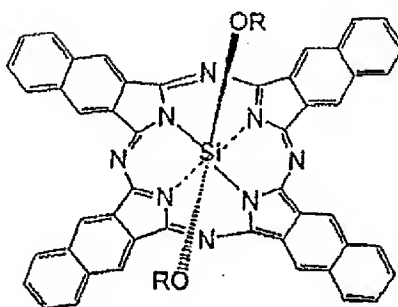
アントラニロシアニン

**FIG. 1**

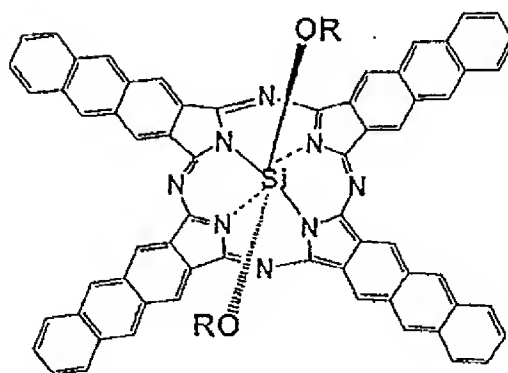
【図2】



シリコンフタロシアニン



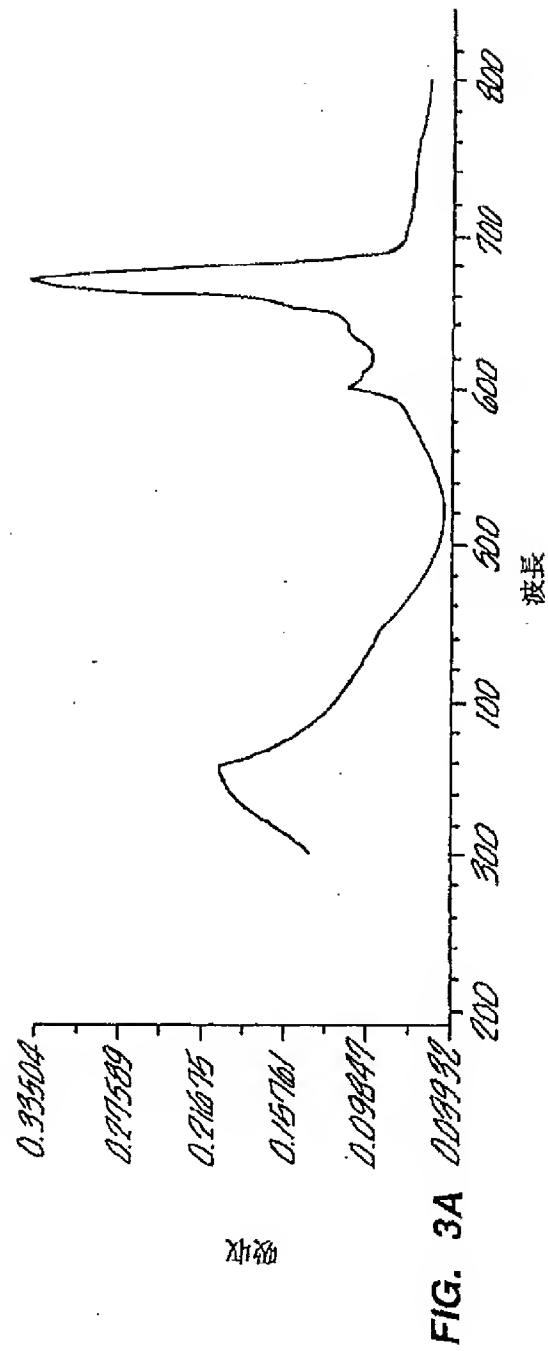
シリコンナフタロシアニン



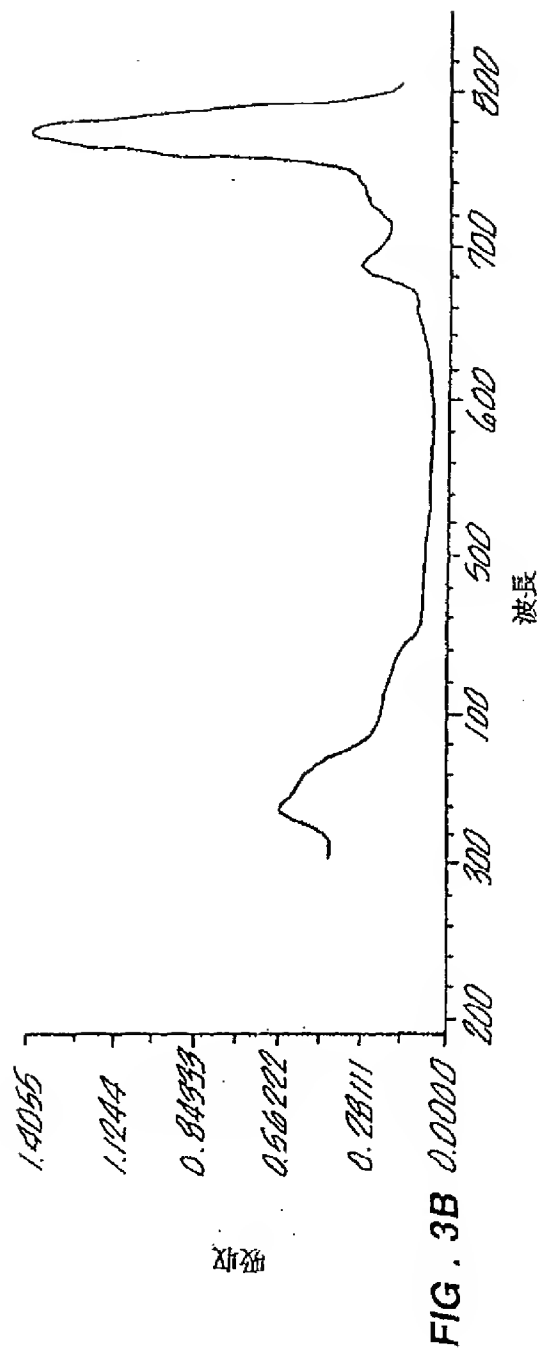
シリコンアントラニロシアニン

FIG. 2

【図3A】



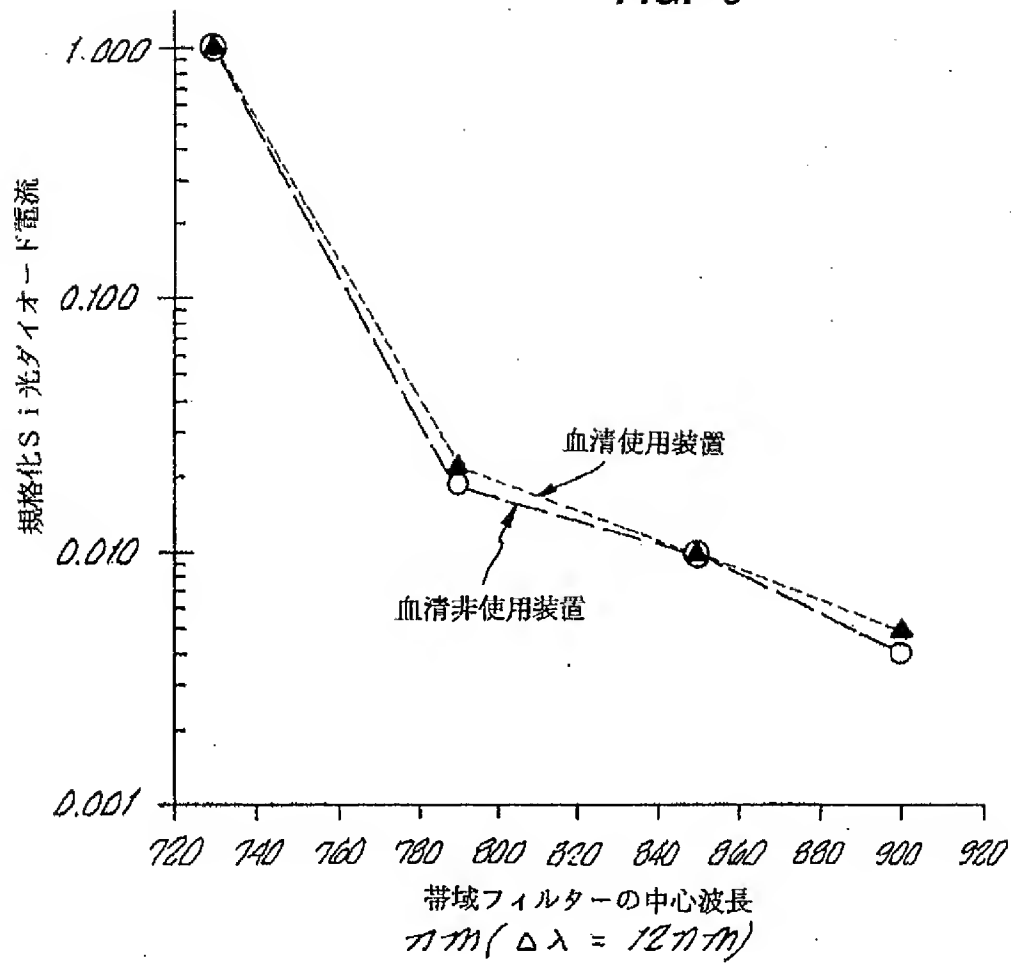
【図3B】





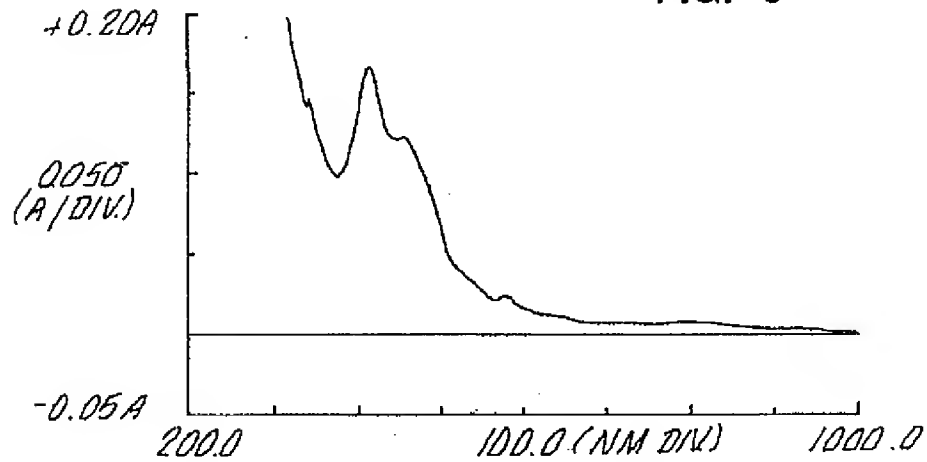
【図5】

FIG. 5



【図8】

FIG. 8





【图6】

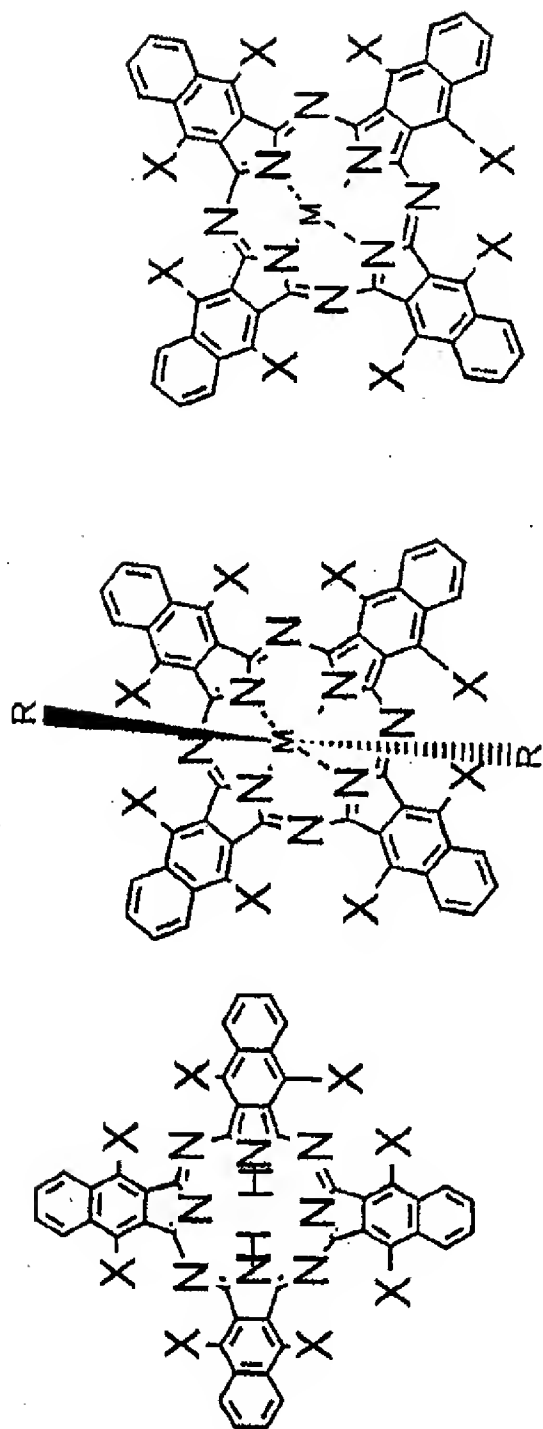


FIG. 6

【图7】

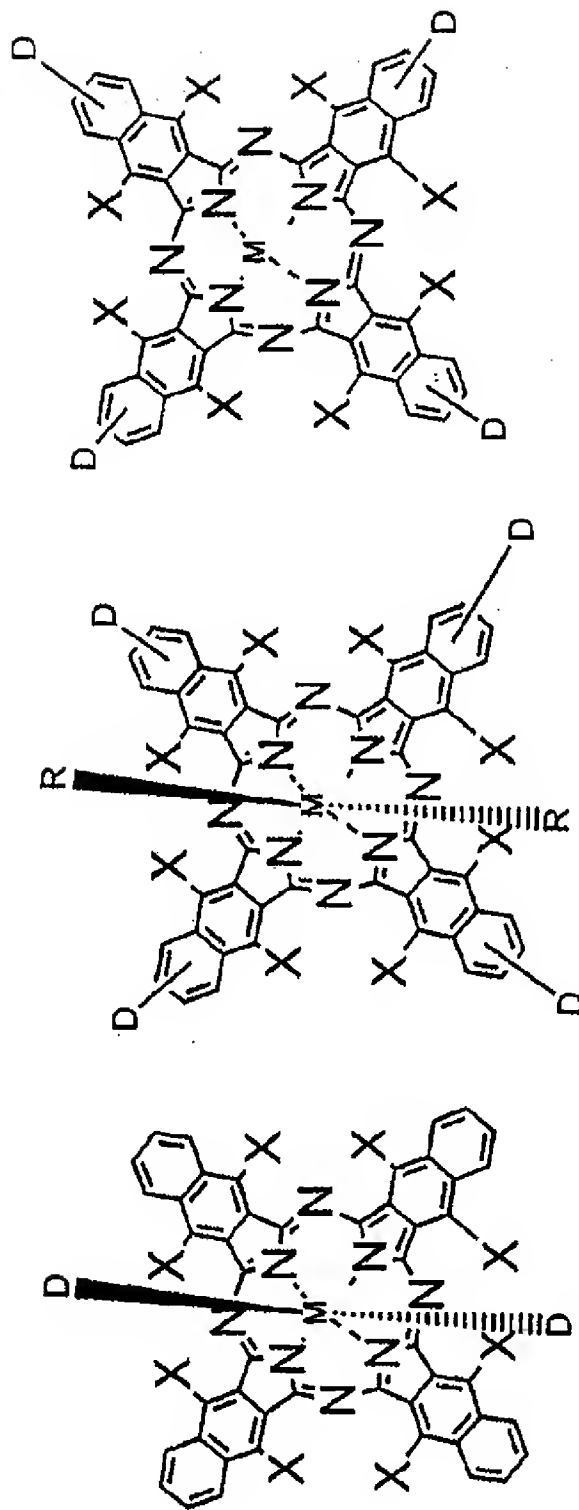


FIG. 7

## [ 国際調査報告 ]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/10826

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G01N 33/546; C09B 47/04

US CL : 436/534; 252/301.16; 428/401; 540/128

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 436/534, 518, 528, 531, 533; 252/301.16, 301.35; 428/401; 540/128

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN, APS

search terms: fluorescent particle, energy transfer

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P --- Y,P	US, A, 5,326,692 (BRINKLEY ET AL.) 05 July 1994, see entire document.	1-105, 109-127, 134-142 ----- 106-108
X --- Y	US, A, 4,666,862 (C'LAN) 19 May 1987, column 4, line 61 - column 5, line 19.	1-105, 109 ----- 128-133, 143-147
Y	WO, A, 88/04777 (STANTON ET AL.) 30 June 1988, see page 5, line 14 - page 7, line 21.	106-108, 128-133, 143-147

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'B' earlier document published on or after the international filing date	* Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* A	document member of the same patent family
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

01 DECEMBER 1994

Date of mailing of the international search report

12 JAN 1995

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

LORA M. GREEN

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/10826

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of the American Chemical Society, Vol. 106, issued 1984, Wheeler et al., "A Silicon Pthalocyanine and a Silicon Naphthalocyanine: Synthesis, Electrochemistry, and Electrogenenerated Chemiluminescence", pages 7404-7410, see Figure 1.	128-133, 143-147

---

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
// C 0 7 D 487/22		7019-4C	
C 0 7 F 7/10		V 8829-4H	
(31)優先権主張番号	08/274, 534		
(32)優先日	1994年7月12日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP		
(72)発明者	タデッセ、レマ アメリカ合衆国92126カリフォルニア、サン・ディエゴ、ニュー・サレム・ストリート 8580番		